

CARYOLOGIA

Giornale di Citologia, Citosistemica e Genetica
Journal of Cytology, Cytosystematics and Genetics

Fondato
da
ALBERTO CHIARUGI



Editore e Direttore:
EMILIA MESSERI CHIARUGI

Condirettore resp. e Redattore:
FERNANDO FABBRI

Comitato di consulenza scientifica:

EMILIO BATTAGLIA
MARIO BENAZZI
VINCENZO CHIARUGI
GIUSEPPE COLOSI
ROBERTO CORTI

FRANCESCO D'AMATO
ELEONORA FRANCINI CORTI
GIUSEPPE MARTINOLI
ALBINA MESSERI
EMANUELE PADOA

RODOLFO PICHI-SERMOLLI

FIRENZE

INDUSTRIA TIPOGRAFICA FIORENTINA

1960

NORME PER I COLLABORATORI

CARYOLOGIA è un periodico dedicato alla pubblicazione di ricerche originali di citologia, di citosistemica e di genetica su piante e animali. Ogni Volume viene pubblicato annualmente suddiviso in tre fascicoli e comprende circa 450-500 pagine (*Prezzo di abbonamento per tutti i paesi: Lit. 4800 al Volume*).

Le memorie, gli abbonamenti e la corrispondenza relativa devono essere inviate al seguente indirizzo: Dr. Fernando Fabbri, Redazione di "Caryologia", Via Lamarmora, 4 - Firenze.

MANOSCRITTI - Le memorie possono essere redatte in italiano, in francese o in inglese. Devono essere presentate nella forma definitiva e dattiloscritte. Il nome degli Autori citati nel testo deve essere scritto tutto con lettere maiuscole e deve essere seguito, fra parentesi, dall'anno in cui il lavoro citato è stato pubblicato. La successione delle varie parti della memoria deve seguire quest'ordine: testo della memoria, bibliografia, spiegazione delle eventuali tavole fuori testo, « summary » riassunto; in un foglio a parte deve essere scritta la spiegazione delle eventuali figure nel testo. La bibliografia, elencata sotto forma di lista in ordine alfabetico, deve essere compilata attenendosi *strettamente* ai seguenti esempi:

BRACHET J., 1957. — Biochemical cytology. Academic Press, New York.

CHIARUGI A., 1938a. — La cariologia e le sue applicazioni a problemi di botanica. Atti Soc. Ital. Progr. Sci., 3: 55-92.

—, 1938b. — Osservazioni cariologiche e sistematiche sui generi Kerneria e Rhizobotrya (Cruciferae-Thlaspidinae). Nuovo Giorn. Bot. Ital. n. s., 40: 63-75.

BOZZE DI STAMPA - L'Autore ha diritto alla correzione delle prime bozze durante tale correzione potrà apportare al testo solo lievi modifiche. A giudizio della Redazione possono essere inviate all'A. anche le seconde bozze; durante questa correzione però l'A. dovrà limitarsi a correggere i refusi di stampa e non dovrà apportare modifiche al testo. Tutte le altre correzioni vengono eseguite a cura della Redazione.

ILLUSTRAZIONI - Le memorie possono essere corredate da figure nel testo e da tavole fuori testo. Le fotografie destinate alle tavole fuori testo, stampate su carta bianco-lucida e smaltate, devono essere incollate con la maggiore precisione possibile su un cartoncino, in modo da ottenere un rettangolo di 12 x 18 cm., lato maggiore verticale. Solo eccezionalmente si potranno superare di poco dette misure. Tutte le fotografie di ogni tavola devono essere provviste di un numero progressivo, posto nell'angolo inferiore destro di ogni fotografia.

ESTRATTI - Gli Autori ricevono gratuitamente 50 estratti senza copertina. Possono ottenerne un numero superiore a pagamento: in tal caso dovranno indicarlo nelle bozze il numero desiderato, e se essi devono essere con o senza copertina.

Gli Autori sono responsabili per il contenuto e lo stile delle loro memorie.

CYTOLOGICAL STUDIES IN SOME HIMALAYAN MOSSES

by

K. R. KHANNA

Botany Department, Panjab University, Chandigarh-3, India

(with Plates LXVIII-LXIX and 103 text-figures)

Received: 15th February 1960.

INTRODUCTION

Mosses as a group are comparatively late comers in the field of modern cytology. Though they were the material for various important and fundamental investigations of MARCHAL and MARCHAL (1907, 1909, 1911) and WETTSTEIN (1923, 1924, 1938 etc.) the first serious attempt to study the cytology of wild mosses embracing a number of diverse species was as late as 1928 by HEITZ. This was followed by JACHIMSKY (1935), SHIMOTAMAI *et al.* (1932, 1936) and KURITA (1937, 1939) who along with HEITZ remain the only noticeable earlier workers in the field. Recently the group has received fresh attention due to the pioneering efforts of LOWRY (1948-1954), VAARAMA (1949-1956), STEERE (1954), STEERE *et al.* (1954), BRYAN (1955-1957), YANO (1957*a, b, c*) and ANDERSON and BRYAN (1958*a, b*) etc. These studies though far from being comprehensive yet, nevertheless, provide a sufficiently good sampling of the chromosome situation from various diverse regions of the world, such as the United States (particularly California and Alaska), Finland, Europe and Japan. These results at once point out that unlike liverworts, the mosses show a great deal of cytological variation and complexity as evidenced by high degree of polyploidy, aneuploidy, the occurrence of intraspecific chromosomal races etc. which often obscure the basic chromosome number. These studies call for similar investigations from the other regions of the world.

Because of the great abundance of moss vegetation in the Himalayas which is almost completely unexplored cytologically and the easy access the writer had to these areas that this region was selected for such a

study. It is necessary here to mention the broad pattern of distribution of the moss vegetation in the Himalayas. It is very characteristic here and in the underlying plains of India. One is greatly struck by the meagreness of occurrence of mosses in the plains and lower altitudes of the hills and their abundance at higher altitudes. The total number of mosses known to the writer from the plains of Panjab in the North western part of India does not exceed 20 some of which are very rare or sterile, whereas about 150 species of mosses have been reported from Mussoorie alone (CHOPRA *et al.*, 1956), a small hill station in the outer ranges of the western Himalayas. Like the Hepaticae there are two major factors governing the distribution of mosses. First is the temperature which determines the great contrast in the number of moss species in the plains and the hills and is also responsible for circumscribing mosses within a particular range of altitude. In the Himalayas the mosses are richest both in number of species and individuals between 4,000 — 9,000 ft. in the West and 5,000 — 10,000 ft. in the East. This difference between the West and East is due to the fact that latter is warmer because of a more tropical type of climate. Second important character is the moisture which is governed by the amount of precipitation and its distribution during the year. So closely in fact are the Himalayan mosses related to the availability of moisture that almost all of them have hey day of their existence during the monsoons, i.e. from June to September in the East and July to September in the West. It is also during this season that more than 95% of them fruit. It was observed for instance that during an abnormal season in the year 1955 when the monsoons were early by a fortnight, the mosses also started fruiting a fortnight earlier. This close relationship with moisture is also responsible for governing the distribution of mosses at different altitudes of the Himalayas. Since the outer and the middle Himalayas are the first ranges to meet the monsoons, they experience the highest precipitation which becomes more and more scanty on going farther towards the interior. With this the number of moss species also keeps on decreasing, so that only a small number of moss species is met with in the inner Himalayas. Both because of suitable temperature and moisture the outer Himalayas on the whole are richest in moss vegetation at altitudes mentioned above.

For the purpose of present study two stations in the outer Himalayas were selected, Mussoorie (alt. 6,500 ft., lat. 30.27°N) in the West and

Darjeeling (alt. 7,000 ft., lat. 27.3°N) in the East. The two places are separated from each other by an aerial distance of about 6,00 miles. They are remarkably different from each other in respect of their moss flora and their comparative study provided a representative account of two more or less extreme localities of the Himalayas. All the cytological studies were carried out in the field from July to September as the stored material of sporogonia does not yield satisfactory results. Mosses ranging from 3,000 ft. to 12,000 ft. have been investigated and special care was taken to study the different populations of the same species from different areas in order to ascertain the unequivocal chromosome number and also to note the range of cytological variation in the populations, if any. The mosses that were common both to Mussoorie and Darjeeling were investigated from each area which further helped in appreciating the range of variation present in the Himalayan mosses at the specific level.

The greatest difficulty encountered during the course of the present work was the lack of any adequate taxonomic account on the Himalayan moss flora. But for a mere census of the Himalayan mosses by BRÜHL (1931) no other comprehensive account is available. The taxonomic studies being carried out in this laboratory by Mr. R. S. Chopra and his students, though still in the formative stage, were a source of very great help. The identification is in the main due to the help rendered by Mr. A. H. Norkett of the British Museum (Natural History) London, who had at his disposal many collections of Himalayan mosses determined by late Mr. H. N. Dixon. The voucher specimens⁽¹⁾ have been numbered and deposited in the Moss Herbarium of the Botany Department, Panjab University, Amritsar.

MATERIAL AND METHODS

The material for study was collected from the localities mentioned above. The chromosome number was determined exclusively from the meiotic studies. It was found that the external appearance of the spo-

(1) Since a moss plant usually bears a single capsule which is squashed for the cytological investigation the rest of the patch (including a number of plants of the same species) is kept as record for identification and further study. These are the plants that have been deposited in the Panjab University Moss Herbarium as voucher specimens.

rogonium is well related to the time of meiosis and is more or less characteristic for each species during the normal season of growth. The well known character of just browning of annulus at the time of meiosis (STEERE, 1954) is found to be variable from species to species. In *Bambula constricta* and in a number of others it was found that at the time of meiosis the colour of the annulus is deep red. The size of the capsule too, is not a rigid character. Though in most of the mosses the meiosis occurs in those capsules which had attained their full size (as also pointed out by LOWRY, 1953), in all the *Philonotis* species it takes place at quite a young stage. Similarly the colour of the sporogonium at meiosis is also variable in the different species ranging from whitish opaque in *Philonotis* to translucent green in majority, to yellowish green in *Ditrichum*, *Dicranella* and some other Dicranaceae. The characters vary considerably with the change of season. Since in each patch there are available a number of sporogonia at various stages of development, it is easy to work out the sporophyte-meiosis correlation for each species individually, after a little trial. This facilitates further investigation.

There is no fixed time when meiosis takes place in mosses. Generally speaking, in the Himalayas the meiotic divisions are more prolific in the afternoons than the mornings. The fixatives, whenever used, were acetic alcohol (1:3) and Carnoy's fluid. The latter was very useful in dissolving some refractive bodies found in spore mother cells of some mosses, in a relatively very short period of time. Both of these, however, cause the clumping of chromosomes. So whenever possible, the material was tried without the help of any fixative, which gave clear and well spread chromosome plates.

For squashing the usual aceto-carmine technique was followed.

The slides in the initial stages were made permanent in euparal. This medium was selected because it involves only a small number of steps thus minimising the chances of losing the mother cells and is also less time consuming. But it was soon discovered that it is highly unsuitable under the humid conditions which prevailed in the area. The slides absorb a good deal of moisture resulting in fading of chromosomal stain. On this account the slides were subsequently made permanent in Canada balsam to obviate the risk.

OBSERVATIONS

*Ditrichaceae**Ditrichum tortile* (Schrad.) Lindb.

It is a soil growing species, on the sides of the roads and bare forest slopes. The material was studied both from Mussoorie (Jabber Khet and Woodstock College Road) and Darjeeling (Jalpahar) Himalayas. From both the places uniform cytological behaviour was observed, the chromosome number being $n = 14$ (Figs. 1, 2). This includes a minute 'm' bivalent conspicuous by its small size, weakly staining behaviour and precocious disjunction. Often when it is not precocious it is hard to differentiate because of its erratic size due to variation in condensation. In the complement there can also be observed one decidedly large bivalent but with not very sharp differentiation in size from the others.

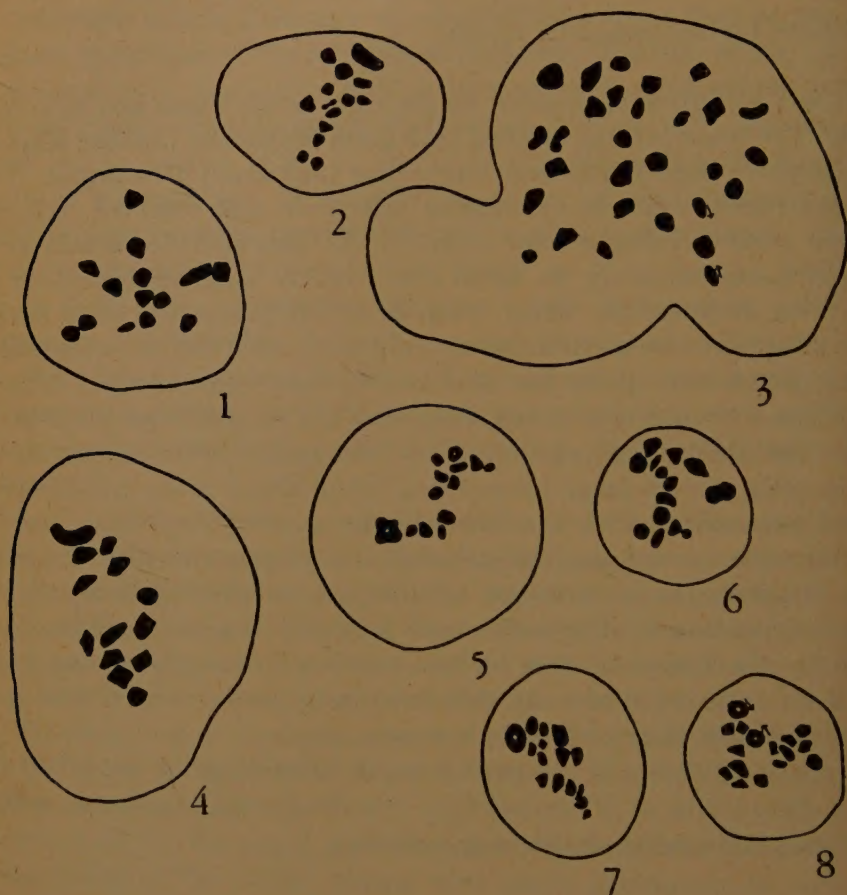
In the Darjeeling population of this species were often observed mother cells of very large dimensions, being about twice the size of the normal ones mixed with the latter in the same sporogonium. Because of their rare occurrence the detailed study was difficult. In one of them, however, the chromosome number was counted to be 28 (Fig. 3). The configuration of this mother cell is highly suggestive of its having arisen by the fusion of two mother cells, the contents of one having passed on into the other. If this interpretation is correct this would be the first case of cytomixes in mosses.

VAARAMA (1949) has reported a small percentage of polyploid cells in the sporogonia of *Racomitrium ramulosum* and *Grimmia mühlenbeckii* but their mode of origin is unknown.

Ditrichum heteromallum (Hedw.) Britt.

The most favoured habitat of this moss is clay slopes on the sides of the roads. The material was studied from Darjeeling (Birch Hill Road and Ghoom). The chromosome number is $n = 13$ unequivocally (Fig. 4). A very large number of sporogonia were examined but in no case the minute bivalent characteristic of *D. tortile* was observed. One bivalent is distinctly bigger than the others and is rod shaped in configuration. There is excessive clumping during all stages of meiosis so that it is not easy to get good countable plates.

So far four species of the genus *Ditrichum* have been investigated. Two of them *D. curritucki* $n = 13$ (BRYAN 1956b) and *D. henryi* $n =$ (ANDERSON and BRYAN, 1958a) are haploid like the Himalayan species.



Figs. 1-8: Figs. 1-3, *Ditrichum tortile*; Figs. 1 and 2, M-I showing 14 bivalents; Fig. 1, from Mussoorie; Fig. 2, from Darjeeling, note the large rod shaped bivalent and the minute bivalent disjoining precociously in Fig. 2; Fig. 3, cytomixes; the shape of the mother cell is suggestive of its having arisen by the fusion of two cells; bivalents can be seen at M-I, one of which has disjoined whose homologues are arranged; the minute bivalents are not conspicuous; Fig. 4, *D. heteromallum*, $n = 13$; Figs. 5-8, *Ceratodon stenocarpus*; Fig. 5, $n = 13$; Fig. 6, $n = 14$; Figs. 7 and 8, $n = 13$; a very large bivalent is present in each case which has disjoined into two ring shaped, apparently equal sized partners in Fig. 7. All figures $\times 2100$.

and the other two *D. schimperi* $n = 26$ (STEERE *et al.*, 1954) and *D. pallidum* $n = 26$ (BRYAN, 1956b) are diploid. All these species have been studied from the United States. The basic number of the genus is both 14 and 13, the latter being derived, as shall be brought out elsewhere in the present work.

Ceratodon stenocarpus Bruch and Schimp.

It grows on the forest slopes mixed with grasses. The material was studied from Darjeeling (Sandakphu, 12,000 ft. and Jalpahar, 7,000 ft.). In both the populations so much clumping was observed during meiosis that it was almost impossible to count the chromosome number in majority of the mother cells even though they were at the proper stage. Only in some preparations could the chromosome number be counted at M-I. The chromosome number observed is highly variable and such numbers as $n = 13$ (Fig. 5), $n = 14$ (Fig. 6) and $n = 15$ (Figs. 7, 8) are observed from the same sporogonium. Since $n = 13$ is the established number for this genus, it may be conceived that here too 13 is the actual number and 14 and 15 are the result of fragmentation as will be described below. In the chromosome complement there is observed a very large bivalent which is usually situated at the periphery of the mother cell. It some times appears in the form of a ring. It is more sticky and «flowing» than the rest of the bivalents, a property attributed to heterochromatin (VANDERLYN, 1949). It is distinctly precocious in disjunction and no marked difference in size of the disjoined homologues could be noted.

At M-I and the subsequent stages, meiotic abnormalities make their appearance which are both in the form of clumping and fragmentation. At this stage clumping may involve only some bivalents or all of them, forming one or a number of sticky masses at the equator (Figs. 9, 10). This results in the failure of division and organization of the nuclei either right at the equator (Figs. 11, 12) or irregularly in the cell (Fig. 13). Occasionally the whole clumped mass of chromatin may assume a dumb-bell shaped form (Fig. 14). At A-I chromatin masses, bivalents, or fragments may be left out from the regular organization of the dyad nuclei (Figs. 15-21). They may lie at or off the equator. In one case a big dumb-bell shaped chromatin mass as if in process of division was observed (Fig. 19). An interesting case was seen in the formation of a ring by the extruded chromatin material (Fig. 20). This may either be a case of two «sister re-union» in fragmented chroma-

tids as described by DARLINGTON (1952) for *Trillium grandiflorum* and this structure might have arisen as a product of misdivision and the two parts are still pairing at the ends. In this way it would resemble with the iso-accessory chromosomes observed by ÖSTERGREN (1947) in *Anthoxanthum*. The extruded chromatin masses ultimately organize themselves into the micro-nuclei and as many as seven micro-nuclei may be observed besides the dyad nuclei (Figs. 22, 23). As would be expected the tetrads are produced with a number of micronuclei and fragments (Fig. 24) and occasionally instead of four a larger number of nuclei varying considerably in size is produced (Figs. 25, 26) which would give rise to the polyads. In spite of all these irregularities a good number of normal dyads and tetrads are also produced from each sporogonium.

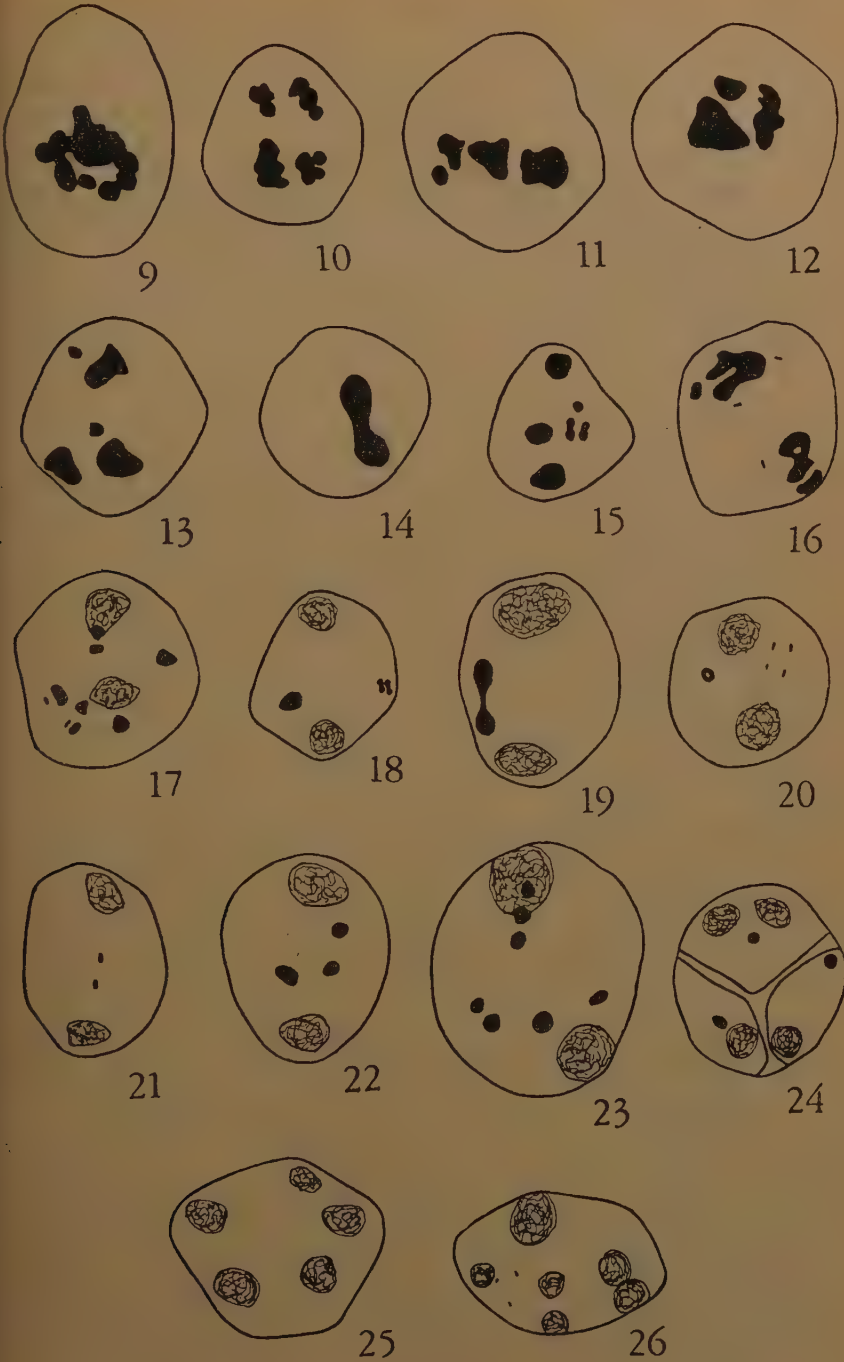
This species has received cytological attention for the first time. Previously two other species of the genus have been worked out, both showing $n = 13$. *Ceratodon purpureus* a cosmopolitan species was investigated by HEITZ (1928, 1932), JACHIMSKY (1935), SHIMOTAMAI and KIMURA (1936), VAARAMA (1950), STEERE (1954) and STEERE *et al.* (1954), and *C. heterophyllus* has been investigated by STEERE (1954) from Alaska.

Dicranaceae

Trematodon sabulosus Griff.

This is a species of the plains. The material was studied from the banks of a drying pond on Jullundur Hoshiarpur Road. The chromosome number is $n = 15$ ($14 + m$) (Fig. 27). The size of the chromosomes is rather small. Two chromosomes of the complement are distinctly larger and similar in shape with a tendency to show earlier disjunction.

Figs. 9-26: *Ceratodon stenocarpus*, various meiotic abnormalities; Figs. 9 and 10, polar view of M-I showing the clumping of bivalents into various groups; Figs. 11-13, the early stages in the organization of the nuclei; Fig. 14, A-I showing extreme stickiness; Figs. 15-23, the occurrence of varying numbers of laggards, fragments, and micronuclei after the first division is over, also note the ring shaped structure left out in Fig. 20, for explanation see text; Fig. 24, the occurrence of micronuclei in the tetrad; Figs. 25 and 26, a large number of nuclei produced at the end of meiosis which will result in the production of polyads. All figures $\times 2100$.



One bivalent which is somewhat smaller than the others shows a very peculiar behaviour. It often lies at the periphery of the mother cell with its partners disjoined. By its distinctive configuration it is recognizable even in the earlier stages. Each of its homologues has the configuration of a horse-shoe. In its shape and behaviour it resembles with the «special bivalent» described by VAARAMA (1950) for a number of pleurocarpic mosses. The minute bivalent is of very small size and may not be clearly visible, being overlapped by the larger bivalent. It was observed in a number of sporogonia and is, therefore, characteristic of this species.

Trematodon cappillifolius C. Müll.

The species is typical of clay slopes, preferring abundant moisture and moderate insolation. The material was studied both from Mussoorie (Burning Ghat and Jabber Khet) and Darjeeling (Gandhi Road). The results were uniform from both the places. The chromosome number is $n = 15$ ($14 + m$) (Figs. 28, 29). Like *T. sabulosus* here too is observed a ring shaped «special bivalent» disjoined into horse shoe shaped homologues. It has the same behaviour as described for *T. sabulosus*. The minute «m» bivalent is precocious as usual. Its uniform occurrence in both the Mussoorie as well as Darjeeling populations shows that it is characteristic of the species.

T. longicollis has been studied by BRYAN (1956b) from U.S.A. who has reported $n = 28$. Further in the same work a number of species of the genus *Bruchia* have also been investigated showing the chromosome numbers $n = 14$, 15 and 28 . This genus is very close to *Trematodon* taxonomically and BROTHERUS (1924) has grouped the two together in the same sub-family Trematodontioideae. On the basis of general behaviour and morphology of bivalents Bryan has pointed out that the

Figs. 27-32: Fig. 27, *Trematodon sabulosus*, $n = 15$ ($14 + m$); Figs. 28 and 29, *T. cappillifolius*, $n = 15$ ($14 + m$); Fig. 28, from Mussoorie; Fig. 29, from Darjeeling; the minute bivalent has disjoined in the latter; Fig. 30, *Dicranella heteromalla*, $n = 13$; Fig. 31, *D. mollicula*, $n = 14$, note the heteromorphic «special bivalent»; Fig. 32, *D. emodivaria*, $n = 15$ ($14 + m$), the minute bivalent is diffused and under stained (dotted). All figures $\times 2100$.



two genera are also very close cytologically. The discovery of $n = 14$ in both the Indian species of *Trematodon* further supports her conclusions. It not only shows the similarity of these species with *Bruchia brevifolia*, *B. fusca* and *B. texana* as regards the chromosome number but also in the presence of a «special bivalent» and minute «m» bivalent. *T. longicollis* $n = 28$ as already stated by Bryan is at a diploid level and would undoubtedly suggest the occurrence in this genus of species with $n = 14$. The two basic numbers 14 and 15 for genus *Trematodon* bring it in line with *Bruchia* which also has the same basic numbers.

Dicranella heteromalla (Hedw.) Schimp.

The material was studied from Darjeeling (Tiger Hill and Tonglu). The chromosome number is $n = 13$ (Fig. 30). One bivalent is large and ring shaped. Usually the pairing of the two partners is very tight and the staining is normal. But sometimes even at metaphase the chromatids are loosely paired, less condensed and erratic in staining. This bivalent is never observed to be precocious in disjunction. In its behaviour and configuration it is very much comparable to the «special bivalent» of VAARAMA (1950), but differs from it in regular and more uniform behaviour.

The present findings are in accord with the report of $n = 13$ for this species from Japan (YANO, 1957a).

Dicranella mollicula (Mitt.) Jaeg.

The species grows on moist soil rich in humus. It also grows on moist rocks. The material was studied from Mussoorie (Jabber Khet and Burning Ghat). There is present a high degree of sterility. The chromosome number is $n = 14$ (Fig. 31 and Plate LXVIII, 1). One of these bivalents is very peculiar in behaviour. In structure it resembles the «special bivalent» type described above. Unfortunately its earlier behaviour could not be studied. At M-I the two partners are precociously disjoined and show a good difference in size. They can often be confused as two separate bivalents. But, since they are often closely associated and sometimes not much disjoined there is hardly any doubt that they represent a single bivalent structure.

Dicranella emodivaria C. Müll.

This species grows in the crevices of the rocks and walls. It fruits at the end of the rainy season and is of rare occurrence. The only population studied was in the vicinity of Savoy Hotel, Mussoorie. The chromosome number is $n = 15$ ($14 + m$) (Fig. 32). The minute bivalent is faintly staining. The species was studied in the beginning of October when in most of the mosses the meiosis is over.

Dicranella spiralis (Mitt.) Jaeg.

The species is soil growing. The material was studied from Tiger Hill, Darjeeling. The chromosome number observed in a number of sporogonia is $n = 15$ (Figs. 33, 34). One of the small bivalents commonly disjoins early. In one sporogonium were observed 14 bivalents and 5-6 small paired fragments and one comparatively larger than the others (Figs. 35, 36). Each disjoined pair resembles the minute bivalent. Though no anaphases could be seen the meiotic behaviour seems to be normal because no laggards and micronuclei could be observed in the dyads and tetrads. It is conjectured that they must have arisen by the fragmentation of one of the bivalents having a diffuse centromere, enabling the resulting fragments to perpetuate normally. Such a case would provide a good source for the spread of accessories in the population.

Dicranella viridissima C. Müll.

The material was studied from Camel's Back Road, Mussoorie. The chromosome number is $n = 16$ (Fig. 37). The two of the bivalents are much smaller than the others and show size difference amongst themselves. In their morphological appearance they look very close to the minute bivalents but unfortunately the material could not be studied in enough details so as to confirm this point.

A number of species of this genus have been worked out from the northern latitudes. STEERE (1954) reported $n = 15$ in all the Alaskan species studied by him, i. e. *D. cerviculata*, *B. grevilleana*, and *D. crispata*. The last named species investigated from a different source has, however, shown $n = 14$ (ANDERSON and CRUM vide ANDERSON and BRYAN, 1958b). This would mean the presence of intraspecific chromosomal races in *D. crispata*. The chromosome number $n = 15$ has also been reported in *D. subulata* (ANDERSON and CRUM vide ANDERSON and BRYAN,

1958b). In some of the Himalayan species too this number has been observed thereby making 15 to be a very common number in the genus on the basis of the species so far investigated. The other species with very different numbers are: *D. viridissima* $n = 16$ (present study), *D. varia* and *D. mollicula* both with $n = 14$ (STEERE *et al.*, 1954 and present study respectively) and lastly *D. heteromalla* $n = 13$ (YANO 1957 and present study). The most interesting is the recent report of $n = 10$ for *D. rufescens* (ANDERSON and BRYAN, 1958b). This is the lowest chromosome number yet reported for the genus.

Undoubtably there occurs a great diversity of chromosome numbers in this genus. There have been two attempts to speculate its base number. YANO (1957a) clearly observed the duplication of karyotype (with the loss of one «H» chromosome) in *D. heteromalla* which would suggest 7 as the base number. ANDERSON and BRYAN (1958b) considered 10 to be the base number on which species with $n = 10$ and 15 are diploid and triploid respectively. It may be pointed out that aneuploidy especially when involving the loss of chromosomes is not unexpected at the polyploid level and the possibility of derivation of numbers like 10 from 14 by loss of 4 chromosomes would not be very far fetched. Further the writer is more in agreement with Yano in considering 7 as the probable base number for the genus because as shall be discussed later this is a prevalent situation in the closely allied genera and the families as well.

Campylopodium griffithii (Mitt.) Jaeg.

Grows on steep clay slopes along forest paths and tea estates. This species was studied both from Mussoorie (Burning Ghat) and Darjeeling (Tea gardens on way to Sedrapong). The chromosome number is $n = 14$ (13 + m) (Fig. 38). There are present the characteristic «special bivalent» and the minute bivalent. The behaviour of the former is similar to that described previously.

Figs. 33-39: Figs. 33-36, *Dicranella spiralis*; Figs. 33 and 34, $n = 15$, one of the bivalents (arrow marked) is precociously disjoining in Fig. 34; Figs. 35 and 36, M-I with 1 bivalents and a small fragment, and a number of other precociously disjoined fragments resembling the minute bivalent; Fig. 37, *D. viridissima*, $n = 16$; Fig. 38, *Campylopodium griffithii*, $n = 14$, note the «special bivalent» and the minute bivalent; Fig. 39, *C. khosianum*, $n = 35$ and a fragment (f). All figures $\times 2100$.



Campylopodium khasianum (Griff.) Par.

This moss, located only once, was found to grow epiphytically on the bark of *Cryptomeria japonica* trees at Jalpahar, Darjeeling. The chromosome number observed from a number of sporogonia is $n = 35 + f$ (Figs. 39, 40). On the basis of chromosome number $n = 14$ observed in *C. griffithii* the present species is at a triploid level with aneuploidy (or at a pantaploid level, if 7 be speculated as the basic number of the group as a whole as shall be pointed out in the later part of the present work).

Both the species as well as the genus have been investigated for the first time.

Campylopus gracilis (Mitt.) Jaeg.

The material for cytological study was obtained from Birch Hill and Jalpahar (Darjeeling). The chromosome number is $n = 13$ (Fig. 41). Two bivalents are very small as compared to the rest and one is conspicuously bigger.

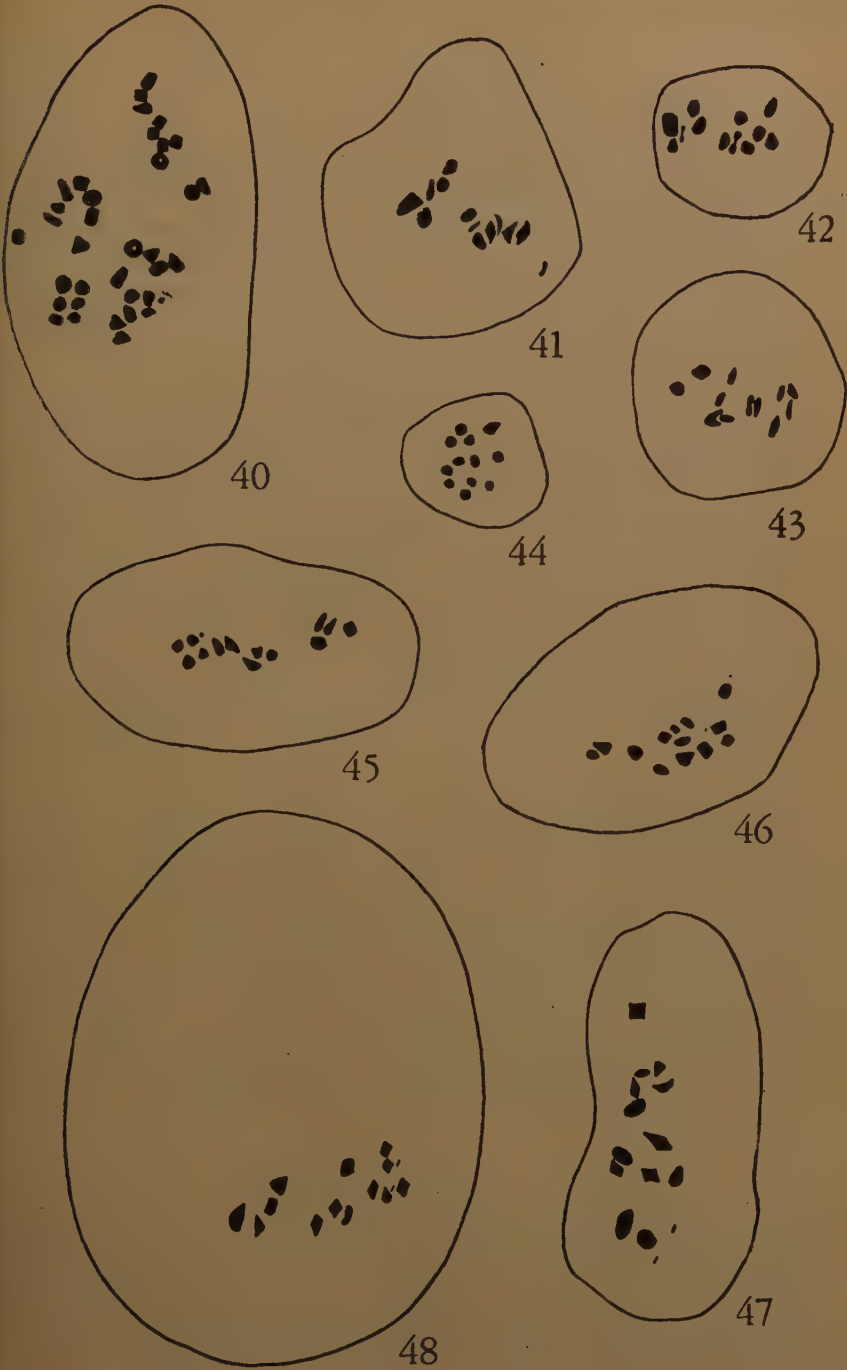
Campylopus laetus (Mitt.) Jaeg.

The species is abundant both at Mussoorie and Darjeeling, but was never observed to fruit at Mussoorie. All the cytological material therefore, came from Darjeeling (Mall Road, Tiger Hill and Gandhi Road). The chromosome number is $n = 12$ (Fig. 42). One distinctly large and one small bivalent which probably represents the minute bivalent can be detected in the chromosome complement.

Campylopus goughii (Mitt.) Jaeg.

The material for study was collected from Sandakphu about 10 miles away from Darjeeling. Because of the scarcity of the material

Figs. 40-48: Fig. 40, *Campylopodium khasianum*, $n = 35 + f$; Fig. 41, *Campylopus gracilis*, $n = 13$; Fig. 42, *C. laetus*, $n = 12$; Fig. 43, *C. goughii*, $n = 12$; Fig. 44, *C. pyriformis*, $n = 12$; Figs. 45 and 46, *Oreoweisia laxifolia*, $n = 14$ ($13 + m$), the minute bivalent has disjoined in Fig. 46; Figs. 47 and 48, *Symblypharis helicophylla*, $n = 14$ ($13 + m$), the minute bivalent is disjoined in both the cases; Fig. 47, var. A and Fig. 48, var. B, note the much larger size of the S. M. C. in the latter. All figures $\times 2100$.



the preparations could be secured from one sporogonium only. The chromosome number is $n = c 12$ (Fig. 43).

Campylopus pyriformis (Schulz.) Brid.

The species grows abundantly in the alpine meadows mixed with grass. The chromosome number was studied from Darjeeling (Tiger Hill). Because of excessive clumping the correct chromosome number could not be established. In all probability it is $n = 12$ (Fig. 44).

The genus *Campylopus* has not been investigated earlier.

Oreoweisia laxifolia (Hook.) Par.

The most favoured habitat of the species is twigs and dead bark of trees. It also grows on rocks and occasionally descends down to the forest floor rich in humus. HERZOG (1926) reports the species as endemic to the Himalayas but according to BROTHERUS (1924) it also occurs in the Mountains of Yunnan which, however, are contemporary to the Himalayas in origin and are more or less continuous with them. The material was studied from Darjeeling (Tiger Hill and Jalpahar). The chromosome number is $n = 14$ ($13 + m$) (Figs. 45, 46). But for the «m» the rest of the bivalents are indistinguishable from each other.

This species as well as the genus has received cytological attention for the first time.

Symblepharis helicophylla Mont.

Two distinct varieties «A» and «B» were recognized for this species. The former is characteristic of the higher altitudes of Darjeeling Himalayas, having been observed growing epiphytically on stunted bushes and fallen tree trunks in the vast, windy and open alpine meadow between Sandakphu and Phalut (10,000-12,000 ft.) and the latter growing at comparatively lower altitudes i.e. Tonglu, Tiger Hill etc. (8,000-9,000 ft.). There is no constant qualitative difference between the two except for the size of the plant and the individual organs.

Variety «A»

Cushion forming moss with the gametophytes much varying in length due to the presence of last year's remnants. The stems of the current year 1-2 cm. tall, erect growing. Leaves 4-5 mm. long, crisped when dry, squarrose from a sheathing keeled base, margin entire below, serrate above; nerve distinctly excurrent; areolations rounded to polygonal, chlorophyllose above, linear rectangular and hyaline below. Seta vary

between 7-10 mm. in length. Capsule cylindrical, furrowed when dry. Peristome inserted much below the mouth of the capsule, consisting of 16 teeth divided almost upto the base. Spores circular, 11.5-19.25 μ in diameter.

Variety « B »

Comparatively more robust and gigas in characters. All the organs are nearly double the size as compared to variety « A ». There is also observable a difference in the size of the cell of the leaves which is well marked in the upper quadratish ones. Leaves upto 8 mm. long, seta 15-18 mm. long. Spores as big as 32-42 μ .

The chromosome number and cytological behaviour for both the varieties is similar and uniform 14 (13 + m) bivalents have been counted in each case (Figs. 47, 48; Plate LXVIII, 2). The minute bivalent is precocious as usual and the other 13 bivalents show similar size and configurations.

The above observations show that the size of the individual plants, organs and particularly of spores may not correlate with chromosome number. Conjectures regarding the chromosome number and level of ploidy on the basis of spore size (BRYAN, 1956b, in case of *Trematodon*) must therefore only be made with great caution especially when even the negative data also exists in this direction (VAARAMA, 1953b in the case of *Tortula*).

Because of similar cytological behaviour and lack of any important qualitative morphological difference the above two varieties are considered only the two ecotypes of *Symblepharis helicophylla*. The size difference between the two may be due to the difference in altitudes at which they grow. The one belonging to the higher altitudes is shorter and stunted in growth, a phenomenon exhibited also by a number of flowering plants growing at higher altitudes in the Himalayas. It would be desirable to study this species from the intervening altitudes and also from the other regions of the Himalayas.

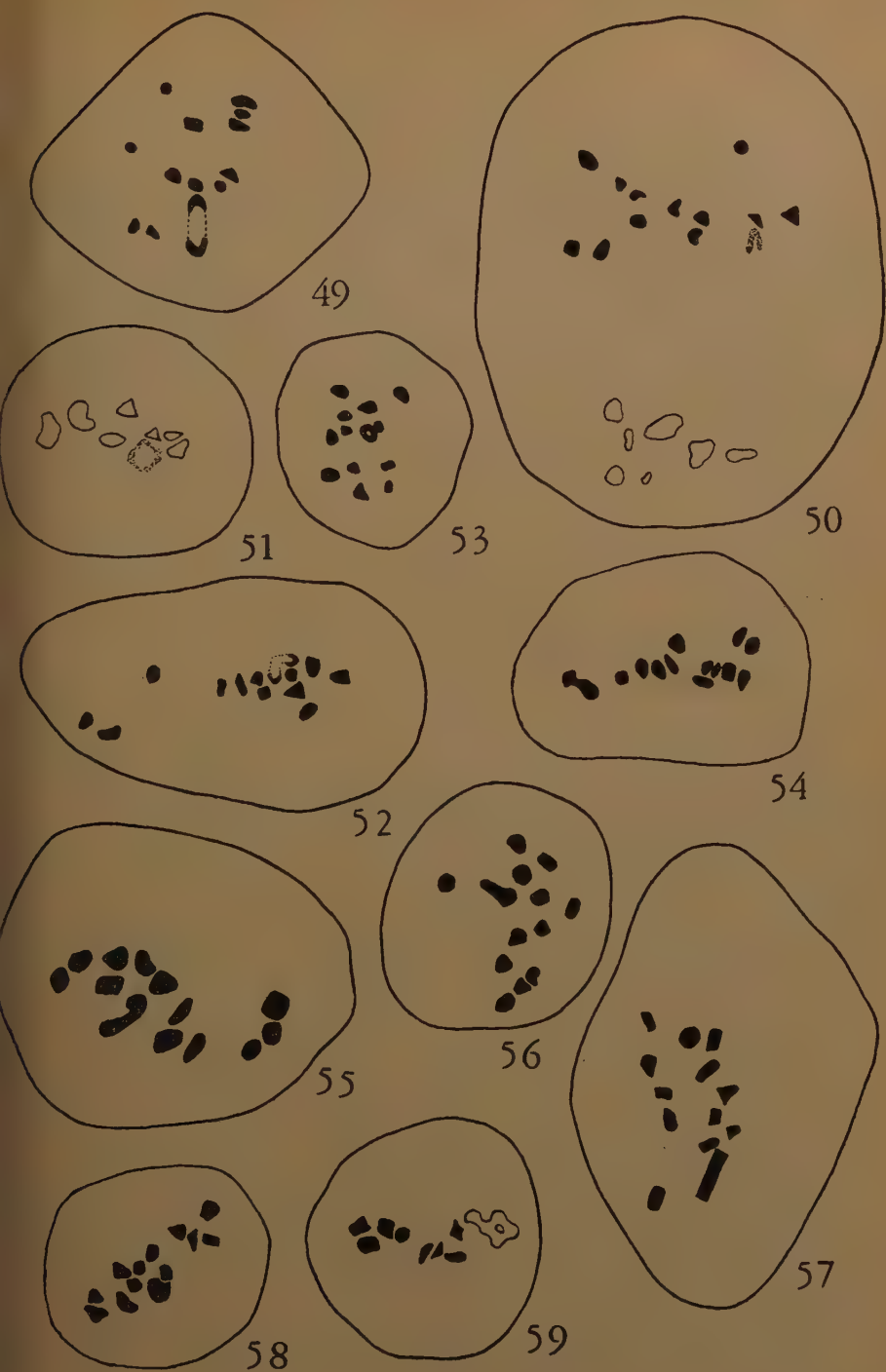
Microcampylopus sp. (2).

It grows on slopes of clay, laid bare by erosion and is common on such habitats along the sides of the roads growing mixed with *Ditri-*

(2) The identification is based on the comparison of this species with *M. subnanus* (C. Müll.) Broth. collected from Palni hills, S. India (P. U. Moss Herbarium n. 669).

chum heteromallum. The material for study was collected from Bihari Hill and Jalpahar, Darjeeling. The chromosome number is $n = 13$ (Figs. 49, 50; Plate LXVIII, 3). The «special bivalent» is present and is decidedly the largest in the complement. VAARAMA (1950 and 1954) believes that the «special bivalent» develops on the surface of a nucleolus in the mother body. During the course of the present study, at the prophase two heterochromatic bodies or one single ring shaped heterochromatic body was observed but their relationship with this bivalent could not be demonstrated. At prometaphase the bivalent is clearly ring shaped. Each chromosome forms one half of the ring and is therefore horse-shoe shaped. The contacts between the chromosomes probably occur at the terminal ends where the chiasmata persist for a short while. At metaphase the two halves are always disjoined, lying opposite to one another and are of equal size. Each disjoined half equals the size of a normal bivalent, and when the spore mother cell is unduly pressed so that the original position and configuration is lost they are indistinguishable from the rest giving an erroneous impression of $n = 14$. At the M-I and subsequent stages, their staining is normal but rarely they might show stickiness and light staining which is a characteristic of the heterochromatin. It may be pointed out that the chromosomes composing the «special bivalent» do not show distant conjugation as described by VAARAMA (1954) but early disjunction because it is possible to see them closely paired in some metaphases. At A-I the chromosomes of the «special bivalent» can be at once recognized by their distinctive shape and size (Fig. 50).

Figs. 49-59: Figs. 49 and 50, *Microcampylopus* sps. Fig. 49, M-I with $n = 13$; Fig. 50, A-I with 13 chromosomes countable at the upper pole, the «special half bivalent» is diffused and understained (dotted); Figs. 51-53, *Syrrhopodon gardneri*; Fig. 51, M-I showing the configuration and the diffused nature of the «special bivalent» (dotted); Figs. 52 and 53, $n = 13$, the homologues of the «special bivalent» are disjoined in Fig. 52 and are tightly paired in Fig. 53; Fig. 54, *Molendoea roylei*, $n = 13$, note the heteromorphic rod shaped bivalent on the extreme left; Fig. 55, *Gymnostomum calcareum*, $n = 13$; Fig. 56, *G. recurvirostrum*, $n = 13$; Fig. 57, *G. aurantiacum*, $n = 13$; Figs. 58 and 59, *Anoetangium thomsonii*; Fig. 58, M-I with $n = 13$; Fig. 59, M-I showing clumping of 5 bivalents (on the right) while the rest are lying well spread. All figures $\times 2300$.



Leucobryaceae

Octoblepharum albidum Hedw.

This species grows on the moist bark of trees under conditions of sub-tropical humidity. It was studied from trees on road to Badamt (3,500 ft.), Darjeeling. Two cytological races, the haploid with $n = 13$ and the spontaneous diploid with $n = 26$ have been discovered. The latter was found to be in a state of active morphological reversion to the former type. It is discussed in detail in a separate paper (KHANNA 1960b, *in press*).

The genus *Octoblepharum* receives cytological attention for the first time.

Calymperaceae

Syrrhopodon gardneri (Hook.) Schwaegr.

Grows epiphytically on the moist bark of *Cryptomeria japonica* trees. The growth on the darker side is more luxuriant. The material was studied from two different populations on Lebong Road, Darjeeling. The chromosome number is $n = 13$ (Figs. 52, 53) of which one is «special bivalent» described previously for various Dicranaceae. At prophase the «special bivalent» appears as a large ring (Fig. 51). The chromosomes are evidently paired. At this stage the staining is much weaker as compared to the normal bivalents. Its larger size and light staining shows that the coiling cycle is progressing much slower. At M-I the chromosomes are disjoined (Fig. 52) but they often also remain paired (Fig. 53). The regular pairing in this bivalent at the early stages and many times at metaphase makes it difficult to think of VAARAMA (1950) that the chromosomes have been conjugating by terminal contacts and no real chiasmata exist between them. The slow pairing segments followed by the early terminalization of the chiasmata seems a more plausible explanation for the falling apart of the chromosomes in most of the metaphases.

This is the only member of the family investigated and this genus as well as the family receives cytological attention for the first time.

Pottiaceae*Molendoa roylei* (Mitt.) Broth.

The species shows a luxuriant growth on the moist shady rocks along the banks of streams where it is often found mixed with *Reimnoria inconspicua*. The studies were carried out from Mossy falls and Balharu Khud, Mussoorie. The chromosome number is $n = 13$ (Fig. 54). One of the bivalents is much larger and distinctly heteromorphic though the difference in the two partners is not very great.

The genus has received cytological attention for the first time.

Gymnostomum calcareum Nees and Horn.

The species is rock growing. The material was studied from Charlie Ville Road, Mussoorie. The chromosome number is $n = 13$ (Fig. 55) with one large bivalent.

Gymnostomum recurvirostrum Hedw.

This weedy species is one of the commonest to be found in the Himalayas. It grows on a variety of habitats and shows considerable morphological variation. The commonest habitats are cemented walls, and calcareous rocks with little humus. It can grow under conditions of low to high insolation.

The material was studied from The Mall, Mussoorie. The chromosome number is $n = 13$ with one usual large bivalent (Fig. 56).

Gymnostomum aurantiacum (Mitt.) Par.

A typical moss of rocks under the deep shade and plenty moisture. The material was studied from Kempty falls, Camel's Back Road and Landour, Mussoorie. The chromosome number is $n = 13$ (Fig. 57), one of the bivalents being largest and distinctively rod shaped.

The genus *Gymnostomum* has received cytological attention for the first time.

Anoectangium thomsonii Mitt.

Growing on the rocks with moderate insolation. The material was studied from various populations of Lal Tiba, Mussoorie. The chromosome number is $n = 13$ (Fig. 58; Plate LXVIII, 4) with one large bivalent which is perhaps one of the biggest of its type to be found in the entire family. It is always peripheral in location, slightly though distinctly heteromorphic and has a tendency to be sticky. The latter character is a feature of heterochromatin.

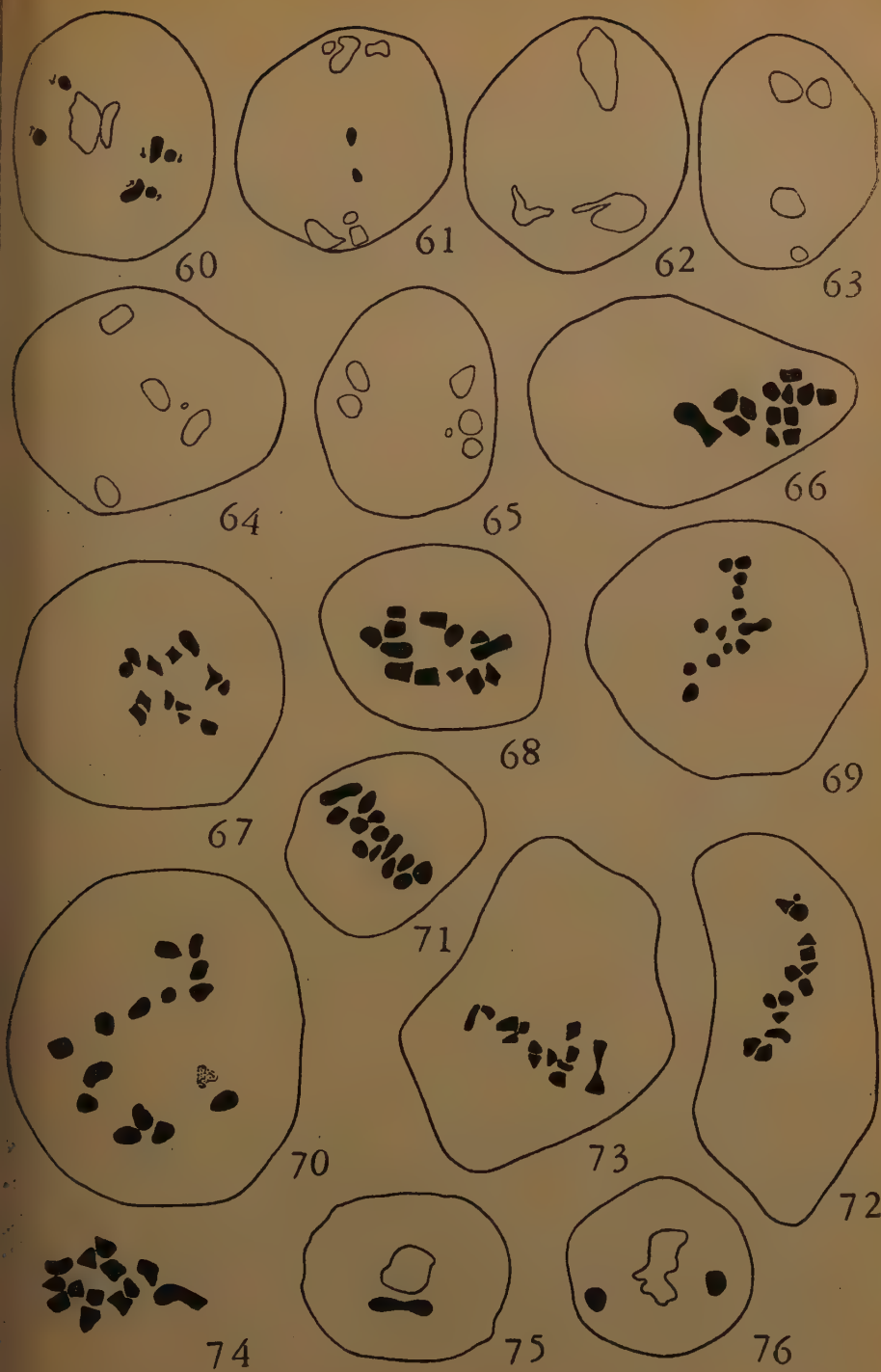
All the bivalents have a strong tendency to agglutinate. This occasionally leads to clumping, fragmentation and irregular separation at the anaphases resulting in laggards and abnormal tetrads etc. (Figs. 59, 65). Some times incomplete anaphases were also observed in which some of the chromosomes have formed a clumped mass and are in the process of organization of nucleus while the others are dividing normally (Fig. 60). In spite of these sporadic abnormalities the vast majority of spore mother cells show regular meiosis and regular tetrads and spores are produced.

Anoectangium stracheyanum Mitt.

The species is very closely related to *A. thomsonii* and they both often grow mixed together in the same habitat. The material for study was collected from Lal Tiba and Burning Ghat, Mussoorie. The chromosome number is $n = 13$ (Fig. 66) which includes a large bivalent.

The genus has been studied cytologically for the first time.

Figs. 60-76: Figs. 60-65, *Anoectangium thomsonii*, various sticky stages of meiosis; Fig. 60, the beginning of A-I, some of the bivalents have disjoined (arrow marked) and the others are still lying in a clumped state; Fig. 61, the laggards after A-I; Fig. 62, probably the irregular division of the lower nucleus after A-I; Figs. 63-65, the irregular formation of the nuclei; Fig. 66, *A. stracheyanum*, $n = 13$; Fig. 67, *Merceya gedeanii*, $n = 13$; Fig. 68, *Hymenostylium curvirostre*, $n = 13$; Fig. 69, *Oxytelus cylindricus*, $n = 13$; Fig. 70, *Timmia anomala*, $n = 15$, the minute bivalent (dotted) at four o'clock is much larger than its usual size (due to delayed condensation) and is understained; Figs. 70 and 71, *Hyophila involuta*; Fig. 70, $n = 13$ (from Mussoorie); Fig. 71, $n = 14$ ($13 + m$) (from Darjeeling); Fig. 73, *Barbula chrenbergii*, $n = 13$; Figs. 74-76, *B. constricta*; Fig. 74, $n = 13$; Figs. 75 and 76, sticky M-I showing the peripheral position of the large bivalent which has precociously disjoined in Fig. 76. All figures $\times 2100$.



DIXON (1954) has put *Anoectangium* in Orthotrichaceae and remarks about it as «A very curious genus, remarkable for the lateral fruiting character which has given rise to much variety of opinion as to its position». Most of the other authors such as BROTHERUS (1924), CRONQ. (1941) etc. have put it under Pottiaceae. The cytological data of $n = 13$ with typical rod shaped large bivalent for both the species investigated supports the conclusion of the latter workers as $n = 13$ and large rod shaped bivalent are the predominant characters of Pottiaceae while they are not so of Orthotrichaceae.

Merceya gedeani (Lac.) Noguchi.

Grows on dark moist rocks and shallow caves. Sometimes it can be found in the open on soil. Unlike most of the species of this genus it bears no relationship to copper or sulphur. The material was studied from Woodstock College Road, Mussoorie. There are present 13 bivalents one of which is characteristically large (Fig. 67).

Weisia viridula (L.) Hedw., *W. crispa* (Hedw.) Mitt. and *W. exserta* (Broth.) Chen.

The material for all the three species was studied from Pathankot. *W. viridula* shows $n = 13$, *W. crispa* also has $n = 13$ but some members of the population showed $n = 14$ ($13 + m$), *W. exserta* is diploid and shows $n = 26$. These are described in detail elsewhere (KHANNA, 1960).

Hymenostylium curvirostre (Ehrh.) Lindb.

The moss hangs in large tufts from dark wet rocks over which there is an incessant trickle of water. The whole patch that way remains richly drenched in water. It is often found mixed with *Reimmersia conspicua*. The material was studied from the Mossy falls and Camel Back Road, Mussoorie. The chromosome number is 13 (Fig. 68).

The genus is investigated for the first time.

Oxystegus cylindricus (Bruch) Hilpert.

Grows on soil rich in humus and receiving good insolation. The chromosome number was studied from plants growing at Birch Hill and Lebong Road, Darjeeling. The chromosome number was invariably found to be $n = 13$ (Fig. 69) and like others there is present a large bivalent.

Timmiella anomala (B. and S.) Schimp.

Grows on humus slopes on the sides of the roads and under the rocks. The populations were studied from Camel's Back Road, Charlie Ville Road and Lal Tiba, Mussoorie. The chromosome number was uniformly observed to be $n = 15$ (Fig. 70; Plate LXIX, 1) at the meiotic metaphases. It lacks the large bivalent characteristic of all the members of Pottiaceae investigated. A study of anaphases would have been very useful but unfortunately no countable cells at this stage could be found. In the complement is also present a small or the minute «m» bivalent described for various Dicranaceae above, but it has a size much larger than any of them. It is very erratic as regards both size and staining. At M-I which is the best stage for its observation it may be quite large and understained or may be much contracted, deeply stained and occasionally disjoined. Another feature of interest observable in this species is the presence of bivalents in groups which give the appearance of secondary association (Plate LXIX, 2). A study from a large number of sporogonia revealed that the behaviour of the species with respect to this feature is not uniform. Moreover, this type of clumping has been observed by the writer in a number of other species as well, occurring irregularly without a definite relation to any known factor.

Previous to this only one species of the genus has received cytological attention. STEERE *et al.* (1954) reported $n = 14$ for *T. vancouveriensis*. These authors do not make any mention of the minute «m» bivalent observed in the present species. Furthermore, these authors reported secondary association for this species as they found usual association of two bivalents. On this they concluded that the species may be at a diploid level. In the writer's opinion a large number of sporogonia must be studied to prove this phenomenon as actual. Even then, how much can we depend on secondary association in concluding the

polyploid nature of the species is doubtful in view of the facts that many earlier interpretations about the level of polyploidy based on secondary association have not stood the test of time (STEBBINS, 1950).

Hyophila involuta (Hook.) Jaeg.

It is one of the commonest of Himalayan mosses growing over stones, stoney walls and boulders near water. Once it was also found growing epiphytically at Senchal Lake, Darjeeling. It shows a very great range of altitudinal variation being met with from 1,000 to 9,000 ft. above sea level. This species was studied from a number of localities both from Mussoorie and Darjeeling. The chromosome number is $n = 13$ (Fig. 71) from all the sources. The large bivalent is present but is not very sharply demarcated from the others. Nevertheless, it can be distinguished by its characteristic elongated rod like shape and peripheral location. It is commonly precocious so that 14 entities are often visible at M-I. Small «m» bivalent was observed only once in a population from Senchal Lake, Darjeeling (Fig. 72) giving $n = 14$.

Recently Anderson and BRYAN (1958b) have reported $n = 13$ for *H. tortula* which is the only previous report on the cytology of this genus.

Barbula ehrenbergii (Lor.) Fl.

[Syn. *Hydrogonium ehrenbergii* (Lor.) Jaeg.].

It grows in mats on the rocky slopes constantly washed by water. Because of the constant erosion of the rock, the small pieces of gravel are entangled in the basal tomentum. This forms a good aerated substratum for the further growth of the moss. The material was studied from Burning Ghat, Mussoorie. The chromosome number is $n = 13$ (Fig. 73). The large bivalent is present as usual. It invariably shows heteromorphy at all metaphase plates. No minute bivalent could be observed in the complement.

Barbula constricta Mitt.

It grows abundantly on stones and walls with slight soil and humus in tufts or even growing individually. The material was studied from various localities of Mussoorie. The chromosome number is $n = 13$ (Fig. 74). The large bivalent is always peripheral in location, a fact that was more marked in plants with sticky metaphases (Figs. 75, 76).

It sometimes gives the impression of heteromorphy during M-I but careful studies particularly at its disjunction (Fig. 76) showed this pair to be homomorphic. This spurious heteromorphy is probably due to irregular «flowing» of the heterochromatin.

Barbula flavescens (Hook and Grev.) Brid.

This species was studied from the Mossy Falls, Mussoorie. The chromosome number is $n = 13$ (Fig. 77). The large bivalent is distinctly heteromorphic (Fig. 78). There is no minute bivalent observed.

In one sporogonium excessive fragmentation was observed. The phenomenon becomes perceptible from M-I onwards. The number and size of the fragments is very variable from cell to cell. M-I in a fairly large number of cells is normal, others show clumping of bivalents (Fig. 79) while still others have fragments in varying numbers (Fig. 80). At the close of A-I these fragments and clumps may remain at the equator as laggards (Figs. 81-83) or they may become irregularly distributed in the cell (Figs. 84, 85). This results in the organization of the nuclei of varying sizes and many micronuclei.

Barbula comosa Doz. and Molk.

[Syn. *Hydrogonium comosum* (Doz. et Molk Hilp.) subsp. *gange-ticum*].

The material was met with only once on a stony wall on Lebung Road, Darjeeling. The chromosome number is $n = 14$ ($13 + m$) (Fig. 86). Previous to this a number of species of this genus have been investigated, most of them having $n = 13$ or 14 . Some cases of aneuploidy have also been met with.

Bryoerythrophyllum atrorubens (Besch.) Chen.

Grows in abundance along small brooks. The general sterility is very high, only some plants bear sporogonia. The material was studied from Jabber Khet, Mussoorie. The chromosome number is 14 ($13 + m$) (Fig. 87). The large bivalent is precocious so that in some cases the number appears $14 + m$. No difference could be detected between the disjoined halves of this bivalent. The minute bivalent was observed in all the sporogonia studied.

Bryoerythrophyllum wallichii (Mitt.) Chen.

Grows on slightly xeric habitats as compared to *B. atrorubens*. The studies were carried out on the material from Depot Round and Jabbar Khet, Mussoorie. The chromosome number is $n = 13$ (Fig. 88). The minute bivalent was observed.

Bidymodon rufescens (Hook.) Broth.

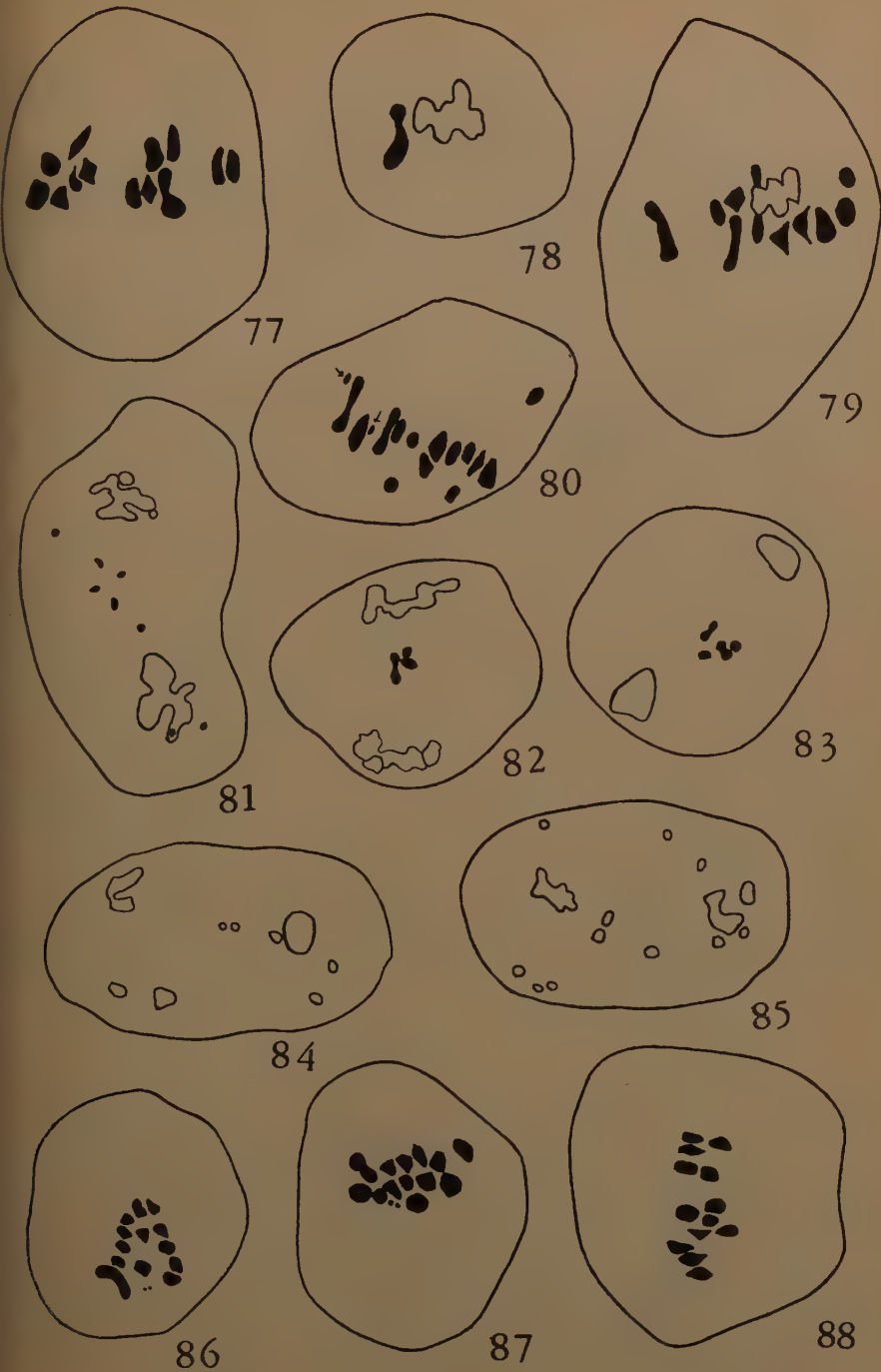
The material was studied from the Mall and Birch Hill Road, Darjeeling. The chromosome number is $n = 13$ (Fig. 89) with one large bivalent, characteristic of the family. No «m» bivalent was observed.

Reimmersia inconspicua (Griff.) Chen.

Most favoured habitat is dark wet rocks in shady environment over which there is a constant supply of water. The entire patch of the moss must remain richly drenched in water acquiring a more or less semiaquatic habitat.

The material was studied from various populations along the Mossy Falls stream, Mussoorie. The chromosome number was uniformly observed to be 14 ($13 + m$) (Figs. 90, 91). The large bivalent is precocious in disjunction and is clearly heteromorphic as observed at M-I (Plate LXVIII, 5) and later when the partners have disjoined at A-I (Fig. 91). The minute bivalent is always observed in the clearly countable plates. It is premature in division and regularly reaches the poles. Its regular occurrence and behaviour suggests that it might be a normal feature for this species. It would be worth while to study this from other localities as well.

Figs. 77-88: Figs. 77-85, *Barbula flavesceus*; Fig. 77, normal M-I, $n = 13$ including one large heteromorphic pair; Fig. 78, M-I particularly showing the peripheral location and the heteromorphy of the large bivalent; Fig. 79, sticky M-I with 3 bivalents fused together; Fig. 80, presence of the fragments (arrow marked) and the earlier disjunction of some of the bivalents; Figs. 81-83, the occurrence of laggards after A-I; Figs. 84 and 85, the organization and irregular location of the micronuclei in the entire mother cell; Fig. 86, *B. comosa* sub sp. *gangeticum*, $n = 14$ ($13 + m$); Fig. 87, *Bryoerythrophyllum atrorubens*, $n = 14$ ($13 + m$); Fig. 88, *B. wallichii*, $n = 13$. All figures $\times 2100$.

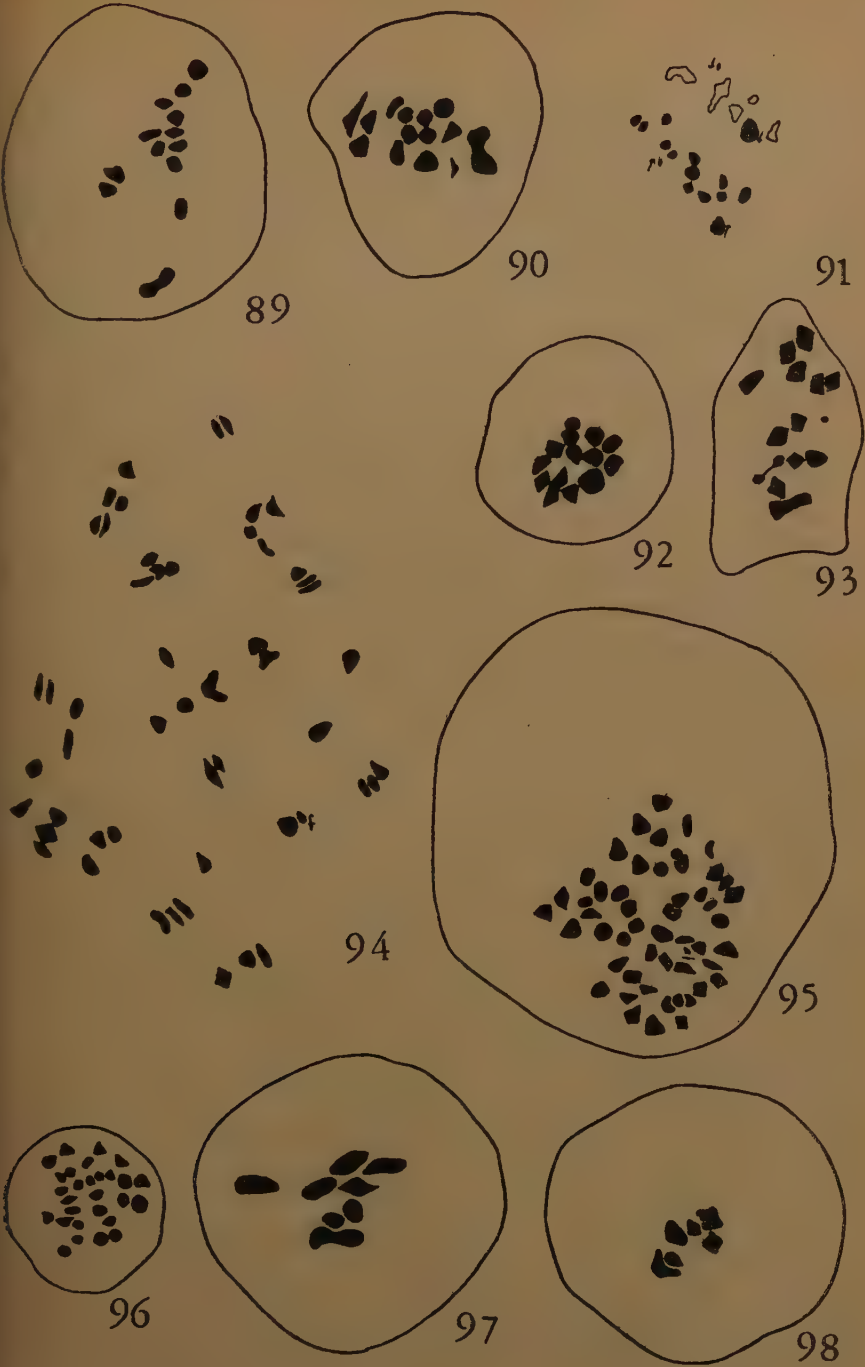


*Grimmiaceae**Grimmia commutata* Huebn.

The species grows on bare rocks and stones in the open forest and naturally prefers high insolation. The material was studied from Jabbar Khet, Mussoorie. This is the only locality from where this species was spotted. The meiotic chromosome number is $n = 13$ (Fig. 92). One of the bivalents is distinctly bigger and very often lies at the periphery of the metaphase plate. It is distinctly precocious and the disjoined partners are of equal size. Therefore, it is not uncommon to find cells with apparently 14 bivalents where the disjoined parts of the large bivalent can no longer be differentiated from the rest. The minute bivalent could not be located though a thorough search for it was made.

The earliest report of the chromosome number for the genus is by HEITZ (1928) who reported $n = c. 20$ for *G. apocarpa*. Since then this polymorphic species has received world wide attention and various numbers such as $n = 12$ (VAARAMA, 1953b) $n = 13$ (STEERE *et al.*, 1954; Ho, 1956) and $n = 14$ (ANDERSON and BRYAN, 1958b; ANDERSON and CRUM *vide* ANDERSON and BRYAN, 1958b) have been reported. In almost all the other species investigated the chromosome number is either 13 or 14. In the former group fall the species such as *G. trichophylla* (STEERE *et al.*, 1954; Ho, 1956); *G. alpestris* (STEERE *et al.*, 1954); *G. affinis*, *montana* (ANDERSON and CRUM *vide* ANDERSON and BRYAN, 1958b) and in the latter group fall the species *G. platyphylla* (STEERE, 1954); *mühlenbeckii* (VAARAMA, 1949). *G. alpicola* has been observed to have both $n = 13$ (ANDERSON and CRUM *vide* ANDERSON and BRYAN *l.c.*) and

Figs. 89-98: Fig. 89, *Didymodon rufescens*, $n = 13$; Figs. 90 and 91, *Reimmersia conspicua*; Fig. 90, $n = 14$ ($13 + m$); Fig. 91, A-I, showing 14 chromosomes clearly at the lower pole, also note the size difference between the disjoined partners of the large bivalent (arrow marked) and the disjoined partners of the minute bivalent (also arrow marked); Fig. 92, *Grimmia commutata*, $n = 13$; Fig. 93, *Racomitrium javanicum*, $n = 14$ ($13 + m$); Fig. 94, *Physcomitrium cyathicarpum*, $n = 51 + f$; Fig. 95, *P. repandum*, $n = 51 + f$; Fig. 96, *Funaria hygrometrica*, $n = 28$; Fig. 97, *Bartramia subpellucida*, $n = 8$; Fig. 98, *Philonotis turneriana*, $n = 6$. All figures $\times 2100$.



$n = 14$ (ANDERSON and BRYAN l.c.). A polyploid *G. patens* shows $n =$ which throws little light on the base number of the genus. The established base numbers evidently are 14 and 13.

G. mühlenbeckii has in common with the Himalayan *G. commutata* the presence of a distinctly large rod shaped bivalent. There have also been observed 2 accessories in the former species which is the first report of accessories for the mosses.

Rhacomitrium javanicum Doz. et Molk.

The most preferred habitat is exposed dry rocks where it grows in dense tufts commonly intermixed with crustose lichens. Essentially a moss of higher altitudes, being most abundant from Tonglu (10,000 ft.) to Sandakphu and Phalut (12,000 ft.) in the eastern Himalayas. It also descends down to a height as low as 7,000 and flourishes there equally well. Like the other members of the family it is recognizable because of the hyaline hair-like tips of the leaves due to which the patch assumes a characteristic appearance. The material was studied from Tiger Hill and Peshok Road, Darjeeling. The chromosome number is 14 (13 + m) (Fig. 93; Plate LXIX, 3). The largest rod shaped bivalent shows no marked difference in the size of the partners at the time of disjunction. The minute bivalent is precocious and is characteristic of this species. It was observed in all the populations studied. On the whole the bivalents have a strong tendency to clump.

The following species of this genus have previously been worked on

<i>R. ramulosum</i>	$n = 14$	(VAARAMA, 1949)
<i>R. heterostichum</i>	$n = 14$	(VAARAMA, 1949)
<i>R. hypnoides</i>	$n = 14$	(VAARAMA, 1949)
	$n = 12$	(YANO, 1957a)
<i>R. fasciculare</i>	$n = 13$	(VAARAMA, 1949)
<i>R. canescens</i>	$n = 12$	(VAARAMA, 1953b)
	$n = 12$	(YANO, 1957a)
var. <i>ericoides</i>	$n = 12$	(YANO, 1957a)
<i>R. depressum</i>	$n = 14$	(STEEDE et al., 1954)

A characteristic feature of all the species worked out by Vaarama that like the present species all of them show one large bivalent with characteristic rod like shape and general properties. This seems to be an established feature of the genus. In none of the species with $n = 14$, was observed the minute bivalent which has been observed in the present species. It supports the contention of the writer that this bivalent is in the process of disappearance and has probably already disappeared in *fasciculare*. The present species thus would fall midway between the species with $n = 14$ on one hand and the species with $n = 13$ on the other.

The species with $n = 12$ are peculiar and are probably derived by either aneuploidy from species with $n = 13$. This would lead one to the conclusion that 14 was the original base number for the genus.

It is not unlikely that a similar situation may be prevailing in the genus *Grimmia* as well, where the predominant number $n = 13$ may have been derived from the species with $n = 14$.

At present the base numbers found in the family are 14, 13 and 12 amongst which 13 and 14 are the commonest. 14 appears to be the original base number from which others have probably been derived.

Funariaceae

Funarium cyathicarpum Mitt.

It is a winter fruiting species of the plains, growing in wet fields and moist garden floors. The material was studied from the fields and Botanical Garden, Khalsa College, Amritsar. The chromosome number $n = 51 \pm 1-2 f$ (Fig. 94). The clearly countable preparations are rather difficult to obtain because of high chromosome number and the excessive clumping characteristic of Funariaceae. In the clear plates no multivalents were observed to be present and in spite of the high chromosome number, the meiosis is perfectly normal.

Funarium repandum (Griff.) Mitt.

This species also grows in the habitats similar to *P. cyathicarpum* and is often mixed with it. The chromosome number in this case also $51 \pm 1-2 f$ (Fig. 95).

Both these species are being investigated for the first time. Previd to this a number of species of this genus have been investigated. The list is given below.

<i>P. pyriforme</i>	$n = 18, 27, 9$	SCHMIDT (1931), BRYAN (1957), PANDE and CHOPRA (1957a)
<i>P. immersum</i>	$n = 54$	BRYAN (1957)
<i>P. eury stomum</i>	$n = 9$	SANNOMIYA (1957)
<i>P. javanicum</i>	$n = 18$	CHOPRA (1959)
<i>P. sp.</i>	$n = 3, 6$	CHOPRA (1959)

The base number for the genus was considered to be 9 until a recent report by CHOPRA (1959) of $n = 3, 6$ for an unidentified species of *Physcomitrium*. This reduces the base number of the genus to 3, but before this is generally accepted, the proper identification of Chopra's *Physcomitrium* species would be highly desirable.

In the light of the above, it can be safely stated that *Physcomitrium* is a genus with highest range of polyploidy amongst the mosses. In this grade of polyploidy both the present species resemble *P. immersum* $n = 54$ (BRYAN, 1957). Slight reduction in chromosome number has evidently occurred in the present species which would not be unexpected at this level of polyploidy.

Funaria hygrometrica Hedw.

This cosmopolitan species grows on the walls and forest floors in thick patches sometimes covering fairly large areas. It is common both in the hills and plains. The material was studied from Birch Hill, Darjeeling. The chromosomes have a strong tendency to clump and it was really difficult to obtain satisfactory preparations. The chromosome number counted at M-I is $n = 28$ (Fig. 96). This is in accord with reports of the previous authors for this species. VAARAMA (1950, 1953), STEERE (1954), STEERE *et al.* (1954), BRYAN (1957) etc.

Funaria wallichii (Mitt.) Broth.

It is a very common moss both at Mussoorie and at Darjeeling. The cytological investigations on this material were carried out on the material

al from Gandhi Road and Old Military Road, Darjeeling. The meiotic chromosome number is $n = 28$. The size of the bivalents is much smaller than that of *F. hygrometrica*.

vartramiaceae

vartramia subpellucida Mitt.

The species grows underneath the rocks and in shallow caves. It prefers less insolation. The species was worked out from Jabber Khet, Mussoorie where it grows in abundance. All the sporogonia investigated showed $n = 8$ (Fig. 97). One large and one small bivalent could be distinguished in the complement though neither of them showed any difference in behaviour from the rest. The early disjunction reported for small bivalent in case of *B. pomiformis* by LOWRY (1954) was not observed in the present species.

The chromosome number $n = 8$ for this species has also been reported by PANDE and CHOPRA (1957b). This is in accord with the chromosome number of the other species of this genus like *B. pomiformis*, $n = 8$ (STEERE, 1954; VAARAMA, 1950; LOWRY, 1954; YANO, 1957a etc.) while it is different from *B. ithyphylla* $n = 12$ (VAARAMA, 1950; STEERE, 1954). These two different numbers for this genus make the question regarding the base number for this genus problematic. Various authors (VAARAMA; STEERE) have conjectured that the base number for the genus might be 4 from which the species with $n = 8$ and $n = 12$ have been derived and are, therefore, diploid and triploid respectively. LOWRY (1954) has suggested an elaborate hypothetical explanation for this possibility. From his study of the karyotype of *B. pomiformis* he could conveniently classify the chromosomes into two groups except the largest and the smallest of the complement which he believes are X and Y respectively and have come to exist in the same individual because of the duplication of the entire set. As a consequence of this the species has become monoecious. Further he conjectures that a mechanism where X would pair only with X, and Y only with Y was established during the course of evolution so that each spore would have both X and Y and the resulting gametocyte would bear both the sexes. Thus monoecism became a uniform and permanent feature of the species.

Though from the karyotype study the duplication seems obvious the large and small chromosomes may not be X and Y. One needs only refer to the extensive studies of the Japanese workers who have demonstrated their presence in the entire group of bryophytes (TATUNO, 1941 and YANO, 1957a, b, c). Both these chromosomes have been observed to occur in every haploid individual irrespective of the sex. They have been called heterochromosomes and have been designated as «H» and «h» by the above authors. Wherever their relationship with sex has been established, the morphological differentiation occurs only between the same type of heterochromosome with respect to sexes and is independent of the other. For example, the «H»s coming from male and female gametophytes may show some differences in morphology which obviously are related with sex and will then be designated as X and Y coming from the female and male respectively. Similarly the «h»s from the two sexes may also be differentiated into x and y, though their relationship in sex has so far been demonstrated only in 4 out of 19 liverworts (TATUNO, 1941), and is entirely unknown for mosses. The two types seem to be independent of each other in their differentiation into sex chromosomes and cannot be considered to represent the same sex-determining pair.

Both the monoecious as well as dioecious conditions are known to occur in different species of the same genus at the haploid level as well as with the same chromosome number with the usual «H» and «h». This is observable in a large number of liverworts (TATUNO, 1941) and some mosses as well. This shows that in the bryophytes monoecism may not necessarily be an outcome of polyploidy.

After having examined Lowry's hypothesis one realizes that the question of the basic number for genus *Bartramia* is in no way solved. The writer finds it hard to subscribe to most of the steps in Lowry's explanation even though 4 may eventually be proved as the base number for the genus. On the other hand the number 8 seems to be fairly well seated and it has been consistently believed as the base number (YANO (1957a and personal communication). For the explanation of the situation in *B. ithyphylla* ($n = 12$) we might have to look to the related genus of the family. *Philonotis*, a closely allied genus shows $n = 6$. It is quite likely that 6 may be the base number for some species of genus *Bartramia* as well of which *B. ithyphylla* has so far been investigated and is diploid. In the opinion of the writer 6 and 8 both should be maintained as the basic numbers of the genus and an explanation of the relationship between them must wait further investigation.

Philonotis turneriana (Schwaegr.) Mitt.

This is one of the most beautiful of Himalayan Mosses. It is of whitish golden colour when in fresh condition. Though it often grows even on stones and walls, its most favoured habitat is crystalline rocks with abundant supply of moisture. The material was studied both from Depot Round and Jabber Khet, Mussoorie. The chromosome number $n = 6$ (Fig. 98, Plate LXIX, 4). All the bivalents are uniform in behaviour though there is a definite gradation of size. No sex bivalents could be located at least on the basis of meiotic studies.

Philonotis heterophylla Mitt.

It grows on stony walls under the deep shade of small herbaceous angiosperms. The material was found only once at Depot Round, Mussoorie. The chromosome number is $n = 6$ (Fig. 99). One of the bivalents shows occasional early disjunction.

Philonotis griffithiana (Wils.) Mitt.

Grows on a variety of habitats, rocks, walls and gravel soil. The material was studied from Lal Tiba and Landour, Mussoorie. The chromosome number is $n = 6$ (Fig. 100).

Philonotis is one of the cytologically very stable genera of mosses. All the previous reports VAARAMA (1953*b*, 1956) and YANO (1957*a*) show that the base number for the genus is 6. Polyploidy has so far been reported in only one species, *P. socia* ($n = 12$) from Japan. This genus is interesting in the sense that some species exhibit various gradations of heteromorphism of sex bivalent. It is well observed in *P. fontana* (VAARAMA, 1956) the difference in heteromorphy being variable between the Finnish and the Irish material. All the Japanese species (YANO, 1957*a*) show the differentiation of sex chromosomes (observed from meiotic studies), the X and Y being differentiated both in morphology and amount of heteropycnosis.

*Leucodontaceae**Leucodon secundus* (Harv.) Mitt.

The species is mostly epiphytic, rarely growing on rocks. The material was studied from Burning Ghat and Jabber Khet, Mussoorie. Nine bivalents are observed at M-I (Fig. 101; Plate LXIX, 5). One biva-

lent represents the sex pair as it is composed of a very large X and a small Y.

The two partners are distinctly precocious in disjunction, this probably being due to the small pairing segments. The A-I is, however, normal and the two disjoined sex chromosomes (X and Y) can still be recognized at the two poles because of the difference in size (Fig. 102). The smallest bivalent of the complement also shows precocious disjunction. The behaviour of the rest of the bivalents is normal.

In one sporogonium were observed 5-6 fragments irregularly lying at the equator after the first division. They are also observed lying outside the tetrad nuclei and not included in them. The mode of their origin and the ultimate effects are not known.

Ho (1956) has reported $n = 11$ in *L. sciuroides*. Recently ANDERSON and BRYAN (1958b) have reported $n = 10$ in *L. julaceus*. They find a large bivalent in the complement which is comparable to the sex bivalent of *L. secundus* described above in all respects except that the homologues composing it are of equal size while there is a great disparity of size between them in the latter species. The large bivalent of *L. julaceus* therefore, is in all probability a sex bivalent. *Leudocon*, therefore, like *Philonotis* (VAARAMA, 1956) is also a genus where the difference of size between the sex chromosomes is different in different species.

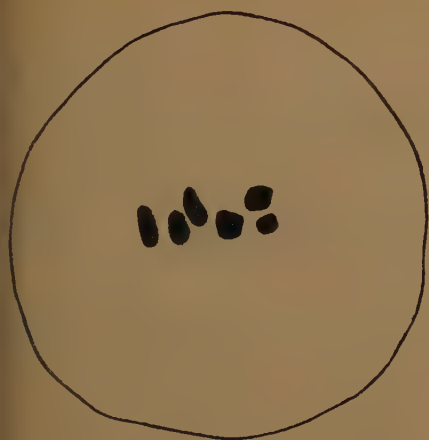
Hookeriaceae

Daltonia semitorta Mitt.

Grows epiphytically on small twigs of shrubs in alpine meadows. The material was studied from Tiger Hill and Tonglu, Darjeeling. The chromosome number is $n = 11$ (Fig. 103; Plate LXIX, 6) which includes 3 large bivalents, 1 minute bivalent and the 7 rest of similar shape and configuration. One of the large bivalents sometimes disjoins earlier than others. The minute bivalent is precocious, as usual.

The genus has been investigated for the first time.

Figs. 99-103: Fig. 99, *Philonotis heterophylla*, $n = 6$; Fig. 100, *P. griffithiana*, $n = 6$; Figs. 101 and 102, *Leucodon secundus*; Fig. 101, M-I with $n = 9$, note the disjunction of the sex bivalent into a large X and a small Y; Fig. 102, incomplete A-I, note the size difference between X and Y; Fig. 103, *Daltonia semitorta*, $n = 11$ ($10 + m$). All figures $\times 2100$.



99



100



101



102



103

Summary of the Observations

TABLE I: Chromosome numbers of the Himalayan mosses investigated.

S. No.	Name of the species	Locality	Meiotic chromosome No.	Panjab Univ. Moss Herbarium No.	Fig. No.
DITRICHACEAE					
1.	<i>Ditrichum tortile</i> (Schrad.) Lindb.	Mussoorie	14 (13+m)	1485	1
2.	<i>D. heteromallum</i> (Hedw.) Britt.	Darjeeling	14 (13+m)	1486	2,3
3.	<i>Ceratodon stenocarpus</i> Bruch and Schimp.	Darjeeling	13	1487	4
		Darjeeling	13 (14, 15)	1488	5-26
DICRANACEAE					
4.	<i>Trematodon sabulosus</i> Griff.	Hoshiarpur	15 (14+m)	1489	27
5.	<i>T. cappillifolius</i> C. Müll.	Mussoorie	15 (14+m)	1490	28, 29
		Darjeeling	15 (14+m)	1491	
6.	<i>Dicranella heteromalla</i> (Hedw.) Schimp.	Darjeeling	13	1492	30
7.	<i>D. mollicula</i> (Mitt.) Jaeg.	Mussoorie	14	1493	31; Pl. LXVIII, 1
8.	<i>D. emodivaria</i> C. Müll.	Mussoorie	15	1494	32
9.	<i>D. spiralis</i> (Mitt.) Jaeg.	Darjeeling	15	1495	33-36
10.	<i>D. viridissima</i> C. Müll.	Mussoorie	16	1496	37
11.	<i>Campylopodium griffithii</i> (Mitt.) Jaeg.	Darjeeling	14 (13+m)	1497	38
12.	<i>C. khasianum</i> (Griff.) Par.	Darjeeling	35+f	1498	39, 40
13.	<i>Campylopus gracilis</i> (Mitt.) Jaeg.	Darjeeling	13	1499	41
14.	<i>C. latus</i> (Mitt.) Jaeg.	Darjeeling	12 (11+m)	1500	42
15.	<i>C. goughii</i> (Mitt.) Jaeg.	Darjeeling	cl2	1501	43
16.	<i>C. pyriformis</i> (Schulz.) Brid.	Darjeeling	cl2	1502	44
17.	<i>Oreoceteisia laxifolia</i> (Hook.) Par.	Darjeeling	14 (13+m)	1503	45, 46
18.	<i>Symblypharis helicophylla</i> Mont. var. A. var. B.	Darjeeling	14 (13+m)	1504	47
		Darjeeling	14 (13+m)	1505	48; Pl. LXVIII, 2
19.	<i>Microcampylopus</i> sp.	Darjeeling	13	1506	49, 50; Pl. LXVIII, 3
LEUCOBRYACEAE					
20.	<i>Octoblepharum albidum</i> Hedw.	Darjeeling	13	1507	
		Darjeeling	26	1508	

28.	<i>Mercya gedraua</i> (Lac.) Noguchi	Pathankot	13	1517
29.	<i>Wetia strigula</i> (L.) Hedw.	Pathankot	13, 14 (13+m)	1518
30.	<i>W. crispa</i> (Hedw.) Mitt.	Pathankot	26	1519
31.	<i>W. caserta</i> (Broth.) Chen	Mussoorie	13	1520
32.	<i>Hymenostylium curvirostre</i> (Ehrh.) Lindb.	Darjeeling	13	1521
33.	<i>Oxystephus cylindricus</i> (Bruch) Hilpert	Mussoorie	15 (14+m)	1522
34.	<i>Timmiella anomala</i> (B. and S.) Schimp.			70; Pl. LXIX, 1, 2
35.	<i>Hyophila involuta</i> (Hook.) Jaeg.	Mussoorie	13	1523
36.	<i>Barbula ehrenbergii</i> (Lor.) Fl.	Darjeeling	13, 14 (13+m)	1524
37.	<i>B. constricta</i> Mitt.	Mussoorie	13	1525
38.	<i>B. flavesens</i> (Hook. and Grev.) Brid.	Mussoorie	13	1526
39.	<i>B. comosa</i> Doz. et Molk sub sp. <i>gangeticum</i>	Darjeeling	14 (13+m)	1527
40.	<i>Bryoerythrophyllum atrorubens</i> (Besch.) Chen	Mussoorie	14 (13+m)	1528
41.	<i>B. wallichii</i> (Mitt.) Chen	Mussoorie	13	1529
42.	<i>Didymodon rufescens</i> (Hook.) Broth.	Darjeeling	13	1530
43.	<i>Reimmertia inconspicua</i> (Griff.) Chen	Mussoorie	14 (13+m)	1531
44.				90, 91; Pl. LXVIII, 5
45.				
46.				
47.				
48.				
49.				
50.				
51.				
52.				
53.				
54.				
55.				

DISCUSSION

Evaluation of ploidy in bryophytes.

It is pertinent to refer here to the controversy on terminology regarding the level of ploidy in a normal bryophytic plant. Since gametophyte is the dominant phase of life cycle in this group all the previous workers have evaluated a plant in terms of gametophyte and hence a plant at the level of its basic number has always been called haploid. Recently some American bryologists (STEERE, 1954; STEERE *et al.*, 1954; ANDERSON and BRYAN 1956, 1958*a, b* etc.) have, however, preferred to designate such a plant as a diploid in order to bring the group in line with the higher plants. In fact the two cannot be compared with regard to this character as in the higher plants the dominant generation is sporophytic. It appears that the new terminology proposed tends towards slight unnaturalness. The old terminology in no way seems inconvenient to those who appreciate this situation in bryophytes. Moreover, many bryophytes are worked out entirely from the gametophytes and some of them always remain sterile, the cytological position of the sporophyte being never known. Such plants in no way can be designated as diploid. In fact the term haploid should also be applicable to all those lower groups where the dominant generation is gametophytic. In the present work, therefore, an individual at the level of its basic number has always been termed as haploid.

Stickiness and clumping.

It was observed to be a general feature of the Himalayan Mosses though it was more pronounced in some cases than in others. Dicranaceae and Funariaceae show maximum clumping on the whole, while in others it is confined only to a few members. It makes the counting difficult and sometimes leads to the wrong interpretation of the chromosome number. This, however, is not uniformly effective and might involve from a few to all bivalents. When this results in a number of groups of bivalents, this gives the impression of secondary associations as described in *Timmia anomala*. It should be clearly differentiated from the true secondary associations. In the light of such observations the cases of secondary association already reported for mosses by STEERE *et al.* (1954), and YANO (1957*b*) are worth a serious reconsideration.

The factors having a marked influence on enhancing clumping are the abnormal weather and the fixatives themselves. The effect of weather became perceptible particularly in *Barbula constricta*, when the meiotic stages during an abnormal (dry and hot) and normal (wet and cooler) season were compared with each other. During the unfavourable season there was strong clumping and no countable metaphases could be obtained, but as the season became favourable, it also became possible to have countable plates with well spread bivalents. The acetic acid even in small quantities in the fixatives makes the chromosomes swell up and in this way the tendency of the chromosomes to clump is increased. As pointed out earlier best results were obtained by trying the material fresh without any prefixation. The excessive clumping is probably one of the factors which leads to fragmentation and abnormal meiosis discussed below.

Chromosome fragmentation and irregular meiosis.

In contrast to the very sporadic and minor meiotic abnormalities reported by the previous workers, the abnormalities observed in the present study are of a much higher order. All ranges of fragmentation were observed. It may be confined only to a single bivalent as in *Dicranella spiralis* or only a low percentage of cells may show clumping and fragmentation leading to irregular spore tetrads as in *Anoetangium thomsonii*. There may be found a number of small fragments at the end of meiosis as is the case in *Leucodon secundus* or their number may be large and variable and size bigger as in *Barbula flavescens*. The severest abnormalities of this type are observed in *Ceratodon stenocarpus* at all stages of meiosis and seem to be widely spread throughout the entire population. Because of the rarity and erratic occurrence of this phenomenon no definite relationship with any factor, environmental or otherwise, could be established.

Sex chromosomes.

A study of the mitotic chromosomes from both the male and the female tissues in dioecious mosses undoubtedly provides the best understanding of the sex chromosomes, which, whenever detected show some difference in the male and the female, may it be that of size, position of the primary constriction, or the amount of heterochromatin. Nevertheless, when there is a marked difference in their size, they can be identified at meiosis because they appear as a heteromorphic pair, i.e. a bivalent

constituted by two chromosomes of unequal size. The relationship between the mitotic sex chromosomes and the meiotic heteromorphic bivalent has been established beyond any doubt in many liverworts and mosses (HEITZ, 1928; JACHIMSKY, 1935; TATUNO, 1941; YANO, 1957). It is, therefore, more or less definite that the heteromorphic bivalent in the bryophytes has much to do with sex determination especially when along with heteromorphy it shows a number of other properties which are usually attributed to the sex determining chromosomes. During the present investigation heteromorphic bivalent has been observed in a number of mosses and circumstantial evidence points to their being sex bivalents. The size difference between the two partners of the heteromorphic bivalent may be very large as in *Leucodon secundus* or it may be just well marked as in *Reimmersia inconspicua* or it may be only slight as in *Molendoa roylei*, *Anoetangium thomsonii*, *Barbula ehrenbergii* and *B. flavescens*. All the above species are dioecious except but for *Leucodon secundus* all belong to the family Pottiaceae. In fact all members of Pottiaceae (except *Timmiella anomala*), Ditrichaceae and Grimmiaceae show a large characteristically rod-shaped bivalent, which while heteromorphic in above mentioned cases is not clearly so in others. It is quite likely that this large bivalent in these cases too has some part to play in sex determination though no proof based on morphological studies is feasible. In addition to the above mentioned characteristics the following ones can also be ascribed to this bivalent by which it may be recognized during the meiotic metaphase.

1) Peripheral location : The large bivalent always occupies a peripheral position which is best seen in the polar view of M-I or in those side metaphases where the pressing of the spore mother cell has been favourable enough to preserve the original position of this bivalent. The various figures of the meiotic stages drawn above give a clear idea of the position for this bivalent. Though it may only be a pressure effect it is occasionally found to lie off the metaphase plate. The peripheral position of this bivalent was very well marked in *Barbula constricta*, when all the bivalents formed one clumped mass at metaphase but this particular one would lie away from the entire group forming sometimes a small blob by itself, or retaining its distinct configuration.

The peripheral location is a characteristic property of heterochromatin and this feature has been observed in various plants and animals. The reasons for this position of the heterochromatin have been discussed by VANDERLYN (1949).

2) Tendency for agglutination: Many times this bivalent shows larger size than usual, flows on itself, becomes sticky and erratically stained. By this feature, when well marked, it can be differentiated from the rest at M-I and at subsequent stages. This is particularly marked in *Anoetangium thomsonii*. This property too is a feature of the heterochromatin.

3) Early disjunction: This bivalent is distinctly precocious in *Weisia viridula*, *W. exserta*, *Hyophila involuta*, *Bryoerythrophyllum rorubens*, *Reimmersia inconspicua*, and *Grimmia commutata*. Since the disjoined homologues are sometimes indistinguishable from the normal bivalents the chromosome number may appear higher by one (two, in the case of *W. exserta* which is a diploid). That this may be a source of error in counting is obvious from the work of VAARAMA (1950) who reported $n = 14$ for *Weisia viridula*, for which the correct number in fact is $n = 13$ (STEERE *et al.*, 1954; BRYAN, 1956a and the present work).

The earlier disjunction is paradoxical to the large size of the bivalent and the larger bivalents take longer time to disjoin. The obvious reason here is that the pairing segments must be short so that the terminalization of chiasmata takes place quickly resulting in early falling apart of the univalents.

The «Special bivalent».

VAARAMA (1950) first observed this bivalent in some pleurocarpic mosses. It is characterized by having a ringshaped configuration at diakinesis and M-I, the two partners of the ring are often disjoined precociously into two horse-shoe shaped structures. Furthermore, it has a slower cycle of coiling so that at M-I it may not have undergone full condensation and, therefore, may be diffused and faintly staining. These characters can be ascribed to its heterochromatic nature. During the course of the present study it has been met with in various mosses belonging to the families Dicranaceae, Leucobryaceae and Calymperaceae. Since none of these families is pleurocarpic it implies that this bivalent is not characteristic of the pleurocarpic mosses alone and hence no definite decision can be based on the presence of this bivalent regarding the affinity of a particular species with the acrocarpic or the pleurocarpic group as done by VAARAMA (1954) for *Hedwigia ciliata*.

It has been observed that in the case of *Dicranella mollicula* this bivalent is heteromorphic and in this respect it is comparable to the

similar heteromorphic «Special bivalent» of *Hygrohypnum luridum* (VAARAMA, 1956). This heteromorphy coupled with its heterochromatization nature points to the fact that it may have a role in sex determination.

The minute bivalent.

It is characterized by its smallest size in the complement, early disjunction, some slight variation in internal coiling system with consequent effect on size and staining. It has been observed in the following — *Ditrichum tortile*, *Trematodon sabulosus*, *T. cappillifolius*, *Dicranella emodivaria*, *Campylopodium griffithii*, *Campylopus laetus*, *Oreoweisia laxifolia*, *Symblepharis helicophylla*, *Weisia crispa*, *Timmiella anomala*, *Hyophila involuta*, *Barbula comosa*, *Bryoerythrophyllum atrorubens*, *Reimmersia inconspicua*, *Rhacomitrium javanicum* and *Daltonia semitorta*.

The small bivalents of certain Dicranaceae like *Dicranella viridissima* and *Campylopus gracilis* show an intermediacy between the «minute bivalent» and the other bivalents. Whether these cases can be placed under the category of «minute bivalent» is difficult to decide.

The size and occurrence of this bivalent is a variable feature in different species. It is fairly large in *Timmiella anomala* though normally it is very minute. There is also a variation in the presence of the bivalent within the genus *Trematodon*. Whereas it is present in both the Himalayan species of this genus it was not observed in the Californian species, *T. longicolis* (BRYAN, 1956b). In some cases it may be present in some members of the population and may be absent in others as in *Weisia crispa* and *Hyophila involuta*. It is hard to say whether these cases represent the disappearance of the minute bivalent in progress or it is just the erratic occurrence of an accessory chromosome. In comparison with the regular minute bivalent with which they resemble in essential details it appears that the former interpretation is nearer the truth.

The writer entirely agrees with STEERE (1954) that these minute bivalents must be considered a regular feature of the complement instead of regarding them as accessories (VAARAMA, 1953a). Unlike the accessories they show uniformity in number and behaviour in the different populations and in all the members of the same population. For instance the minute bivalent, of *Ditrichum tortile* and *Trematodon cappillifolius* showed a remarkable constancy of occurrence in populations separated from each other by hundreds of miles. Like the Californian (STEERE

1954) and Alaskan (STEERE, 1954) mosses the minute bivalent is characteristic of many Himalayan mosses as well, and must be considered part and parcel of their genetic system.

The basic numbers of the families.

Most of the mosses worked out in the present investigation fall under stenocarpus except for *Leucodon secundus* and *Daltonia semitorta* which are pleurocarpic. Since this classification of mosses is not a natural one, DIXON'S (1932) classification has been adopted. Following Dixon, the investigated families fall under two sub-clans, the Haplolepideae and the Diplolepideae of the clan Arthrodonatae. The Haplolepideae is characterized by a single row of peristome teeth and includes the families Ditrichaceae, Dicranaceae, Leucobryaceae, Calymperaceae, Pottiaceae and Grimmiaceae, while the Diplolepideae is characterized by a double row of peristome teeth and includes the families Funariaceae, Bartramiaceae, Leucodontaceae and Hookeriaceae. Most of the members studied fall under the first group, which indeed is more interesting and is, therefore, proposed to be discussed in greater detail.

Ditrichaceae has the number 13 both in *Ditrichum heteromallum* and *Leucodon stenocarpus* and 14 ($13 + m$) in *Ditrichum tortile*. In the highly aneuploid family, Dicranaceae where the problem of the basic number is much complicated, the chromosome number 13 or 14 ($13 + m$) is abundantly met with though even 15 is quite abundant and 12 and 11 have also been observed. The common occurrence of numbers 13 or 14 ($13 + m$) is significant particularly on comparison with allied families. It may be interesting to recall that the almost Himalayan endemic *Leucoweisia laxifolia* also shows this very chromosome number, i.e. 14 ($13 + m$). Only one member each for Leucobryaceae and Calymperaceae has been studied and both of them show $n = 13$. In the vast majority of Pottiaceae the chromosome number is 13 though in some it becomes 14 due to the presence of a minute bivalent. In Grimmiaceae the chromosome number is 13 or 14 ($13 + m$).

From the foregoing account one is greatly impressed by the uniformity in the chromosome number of these families. It is either 13 or becomes 14 due to the presence of a minute bivalent. The transition between these two numbers bridged over by the minute bivalent is only minor as the disappearance of this bivalent does not have any marked effects on the individual losing it. The examples are *Hyophila involuta* (present study), *Weisia crispa* (KHANNA, 1960a), *Brachythecium popu-*

leum (VAARAMA, 1950), and *Nanomitrium austinii* (BRYAN, 1957). A perusal of the literature shows by far the commonest occurrence of numbers 13 and 14 in the above families. It is likely that 14 is the original basic number from which 13 is in the process of emerging through the transitional types with $n = 13 + m$. The only family showing exception to this rule is Dicranaceae where aneuploidy is very prevalent.

The situation observed in the Himalayas shows some contrast to the chromosome numbers observed for these families from other regions of the world, and it is hoped that future data will probably emphasize this fact. Since the family Calymperaceae is cytologically unworked, far the question of its comparison does not arise. For Ditrichaceae number $n = 12$ is known for *Trichodon cylindricus* from Alaska. In Dicranaceae various numbers comparable to Himalayan ones are known and in that way do not offer much contrast. In Leucobryaceae though no other species of *Octoblepharum* has so far been worked out, two different numbers are known for the genus *Leucobryum*, $n = 11$ for *textori* from Japan (YANO, 1957) and $n = 14$ for *L. glaucum* (HO, 1957). For Pottiaceae worked out from other geographic regions the conclusion regarding the base number is obscured by high degree of polyploidy and aneuploidy as stated by STEERE (1954). «No basic number is obvious in this family, probably because of the prevalence of polyploidy and occurrence of aneuploidy, and partly because of the inherent complexity of the family...». Later workers like BRYAN (1956a) have tried to establish 13 as the base number for the family. Aneuploidy is obvious even at the haploid level. For instance, $n = 11$ and 12 have been reported for two species of *Barbula* and $n = 12$ for two species of *Tortula* (STEERE *et al.*, 1954) $n = 15$ has been reported for *T. laevipila* from California by VAARAMA (1953b). It is an important fact that $n = 14$ could be derived in some Himalayan Pottiaceae from which $n = 13$ is derived. The latter is more or less an established base number for the family and is common throughout the world. In the family Grimmiaceae $n = 13$ is known for *Grimmia apocarpa* from Finland (VAARAMA, 1953b), various species of *Racomitrium* and $n = 22$ for *Grimmia patens* (YANO, 1957a; VAARAMA, 1953b).

The similarity of the chromosome number in these families is greatly suggestive that evolution and speciation in these groups of Himalayan mosses has been through the karyotypic and genic changes within the chromosomes themselves and aneuploidy and polyploidy have played only a minor role.

If 14 is the original base number for these families, it is worth speculating about the origin of this number. The suggestion by STEERE *et al.* (1954) that some of these families may already be at a «tetraploid» level (diploid according to the present terminology) seems very pertinent, but how much of it can we conclude on the basis of so-called secondary association is problematical. The number 14 seems to have been derived from some lower base number, as for this to be a primary base number is inconceivable when we view the situation in mosses as a whole. The karyotypic data would have been of much help in solving questions of this nature but unfortunately it is very scarce for these families. The only evidence the writer is aware of is the karyotype of three members of Dicranaceae, i.e. *Onchophorus wahlenbergii*, *O. virens* and *Dicranella heteromalla* which are highly suggestive of duplication of the entire chromosome set (YANO, 1957a). This would suggest 7 to be the original primary base number of the family though further evolution has obscured it in many present day members. A similar situation may be discovered in the members of the other families which along with Dicranaceae might have originated from the same common stock with $n = 7$. Since no species with $n = 7$ has so far been discovered in these families studied from a number of unrelated geographic regions, the origin of number 14 must be dating back to a very remote past and the parental stock might well be extinct as is not uncommon in many groups of organisms.

In the second group of families belonging to the subclan Diplolepideae the chromosome number is quite variable within the group and does not differ from the numbers reported elsewhere. The base numbers for Funariaceae are 9 and 14 and for Bartramiaceae 6 and 8. They are in agreement with the existing reports. Little can be said about the original base number for Leucodontaceae and Hookeriaceae as very few members have been investigated. The question whether there is a common base number for the Diplolepideae as a whole must at present be left open.

Polyploidy.

Polyploidy has played an ostensible role in the evolution of higher plants and the recent studies of mosses from Europe and America show a similar situation there as well. The presence of large number of polyploids within families, within genera and sometimes within the same species only emphasize the importance of this factor in these cases.

During the course of the present study covering about 55 taxa mosses both from the eastern and the western Himalayas the writer was surprised by the preponderance of monotonous haploid condition species after species (Table I). Only one triploid i.e. *Campylopodia khasianum* and four diploids, i.e. a form of *Octoblepharum albidum*, *Weisia exserta*, *Funaria hygrometrica*, and *F. wallichii* are the only polyploids discovered. *Physcomitrium cyathicarpum* and *P. repandum* are not included in the above list, as they are not truly Himalayan mosses and were studied only from the plains of Punjab (Amritsar). All these mosses except for *Leucodon secundus* and *Daltonia semitorta* belong to acrocarpic group which is particularly rich in polyploids from the other regions of the world. That the lack of polyploidy is a general characteristic of the Himalayan mosses is clear from Table II. It is compiled on the basis of published and unpublished information of the writer.

TABLE II: The occurrence of polyploidy in the Himalayan mosses.

Number of taxa investigated	Grade of Polyploidy			Authority
	Haploid	Diploid	Triploid	
20	19	1	—	CHOPRA and SHARMA (1958) and P. D. SHARMA (unpub.)
2	2	—	—	CHOPRA (1957)
1	—	1	—	CHOPRA (1959)
3	3	—	—	PANDE and CHOPRA (1957b)
6	5	1	—	PANDE and CHOPRA (1958)
4	2	2	—	CHOPRA and BHANDARI (1959)
53	48	4	1	Present work (Only those species are mentioned that are not given above)
8	7	1	—	MEHRA and BATRA (unpub.) (Only those species are mentioned that are not given above).
96	86	10	1	

It may be further observed that the highly polyploid families like Pottiaceae (from America and Alaska) and Bryaceae (from Alaska) show very little polyploidy in the Himalayas. Only one representative Pottiaceae, *W. exserta* which is of recent origin is diploid and only the

members of Bryaceae, *Bryum pseudopachytheca* (PANDE and CHOPRA, 1958) and *Brachymenium nepalense* (MEHRA and BATRA, unpublished) are diploid. *Ditrichum* species are haploid here while the American *D. imperi* and *D. pallidum* are diploid. *Bartramia ithyphylla* from the northern latitudes is diploid while Himalayan *B. subpellucida* is haploid. Bartramiaceae shows the highest number, $n = 16$ in *Conostomum* from Alaska.

Cytological stability of the himalayan moss flora.

From the preceding discussion it seems reasonably clear that the Himalayan mosses, as compared to the mosses investigated from the other regions of the world show a high degree of cytological uniformity which is evident from the following features.

1) The constancy in the basic chromosome number : As discussed earlier the close similarity of the base numbers in the families Ditrichaceae, Dicranaceae, Leucobryaceae, Calymperaceae, Pottiaceae and Grimmiaceae is a feature very characteristic of the Himalayas. The situation is entirely different in the other regions of the world, where not to speak of the uniformity of chromosome number in the different families, a definite number can be traced even within the same family.

2) The lack of polyploidy : There is observable little polyploidy in the Himalayan mosses, a point discussed in detail above.

3) The presence of a rod-shaped bivalent : It is the largest bivalent in the complement and is observable almost invariably in Ditrichaceae, Pottiaceae and Grimmiaceae etc. In the other families like Dicranaceae, Leucobryaceae, Calymperaceae etc. a bivalent comparable to it is observed in many members. Except for Japan no other locality is known to the writer where this bivalent has been reported to occur with such a constancy.

It is hard to visualize at present, with so meagre data available on the various aspects of Himalayan flora in general, the reasons for the cytological conservancy in the mosses discussed above. But it seems certain, however, that these mosses (mostly the acrocarpic ones, which have been studied in greater details here) show a line of evolution uniform and characteristic of their own, so far as the chromosome numbers are concerned. The morphological diversity may have been due to the

karyotypic or the genic changes. The Himalayas then preserve at least in part the original cytological condition of the ancient moss flora which has been complicated and diversified in the North by the more severe geological catastrophes.

ACKNOWLEDGMENTS

I take this opportunity to express my deep gratitude to Prof. P. N. Mehra for his constant encouragement during the execution of this work and for many valuable suggestions. Thanks are also due to Messrs R. S. Chopra and A. H. Norkett for their kind help with the identification of the material and to Mr. R. S. Pathania for the microphotographs of the cytological preparations.

REFERENCES

- ANDERSON L. E. and BRYAN V. S., 1958a. — *Systematics of the autococious species of the genus Ditrichum sub-genus Ditrichum*. Brittonia, **10**: 121-137.
- , 1958b. — *Chromosome numbers in mosses of eastern North America*. Jour. Elisha Mitchell Sci. Soc., **74**: 173-199.
- BROTHERUS V. F., 1924. — *Musci*. In: Engler & Prantl's « Die Natürlichen Pflanzenfamilien ». Vol. **10**.
- BRÜHL P., 1931. — *A Census of Indian Mosses*. Rec. Bot. Survey India, **13**: 1-135.
- BRYAN V. S., 1955. — *Chromosome studies in the genus Sphagnum*. The Bryologist, **58**: 16-39.
- , 1956a. — *Cytological and taxonomic studies of some species of Astomum, Acomidium and Phascum*. The Bryologist, **59**: 118-129.
- , 1956b. — *Chromosomes and systematic position of the inoperculate mosses, Plagiomnium and Bruchia*. Amer. Jour. Bot., **43**: 460-468.
- , 1957. — *Cytotaxonomic studies in the Ephemeraceae and Funariaceae*. The Bryologist, **60**: 103-126.
- CHEN P. C., 1940-1941. — *Studien über die Ost-asiatischen Arten der Pottiaceae*. I. and II. Hedwigia, **80**: 1-76.
- CHOPRA N., 1957. — *Cytology of Rhodobryum roseum (Weis.) Limpr. and Bryum atrovirens Hedw.* Curr. Sci., **26**: 61-62.
- , 1959. — *Cytological Studies in Indian Mosses*. V. Curr. Sci., **28**: 114-115.
- CHOPRA R. S., ABROL B. K. and BANGA M. S., 1956. — *A Preliminary List of the Mosses of Mussoorie (Himalayas)*. Res. Bull. Panjab Univ., n. **85**: 21-30.
- CHOPRA R. S. and BHANDARI N. N., 1959. — *A Preliminary Cytotaxonomic Study of Indian Mosses*. Cytologia, **24**: 358-366.

- CHOPRA R. S. and SHARMA P. D., 1959. — *Cytomorphology of the genus Pogonatum Palis.* Phytomorphology, **8**: 41-60.
- DARLINGTON C. D., 1952. — *The cell and heredity under ionization.* In: Haddow's « Biological Hazards of Atomic Energy ». Oxford.
- DIXON H. N., 1932. — *Classification of Mosses.* In: Verdoorn's « Manual of Bryology ». The Hague.
- 1954. — *Students Handbook of British Mosses.* London.
- HEITZ E., 1928. — *Das Heterochromatin der Moose I.* Jahrb. Wiss. Bot., **69**: 762-818.
- 1932. — *Geschlechtschromosomen bei einem Laubmoos.* Ber. Deuts. Bot. Gesellschaft, **50**: 204-206.
- HERZOG TH., 1926. — *Geographie der Moose.* Jena.
- HO P. H., 1956. — *Etude de la mitose et spécialement du mégachromocentre chez quelques muscinées.* Rev. Gen. Bot., **63**: 237-280.
- JACHIMSKY H., 1935. — *Beitrag zur Kenntnis von Geschlechtchromosomen und Heterochromatin bei Moosen.* Jahrb. Wiss. Bot., **81**: 203-283.
- KHANNA K. R., 1960a. — *Studies in natural hybridization in the genus Weisia Hedw.* The Bryologist, **63**: 4-16.
- 1960b. — *The haploid and the spontaneous diploid race in Octoblepharum albidum Hedw.* Cytologia (in press).
- KURITA M. 1937. — *Geschlechtschromosomen und chromosomenzahlen bei einigen Laubmoosen.* Zeits. f. induk. Abst. Vereb., **74**: 24-29.
- 1939*. — *Chromosomen bei einigen Laubmoosen.* Bot. and Zool. Tokyo, **7**: 385-388.
- LOWRY R. J., 1948. — *A cytotaxonomic study of the genus Mnium.* Mem. Torrey Bot. Club, **20**(2): 1-42.
- 1953. — *The number and morphology of moss chromosomes.* Stain Tech., **29**: 17-20.
- 1954. — *The chromosome number and chromosome morphology of Bartramia pomiformis.* The Bryologist, **57**: 1-5.
- MARCHAL É. et MARCHAL É., 1907, 1909, 1911 *. — *Aposporie et sexualité chez les mousses I, II, III.* Bull. Acad. Belg., Cl. Sci., 765-769, 1249-1288, 750-778.
- MEHRA P. N. and BATRA K. K., 1957. — *Cytological studies in family Bryaceae* (Unpublished).
- OSTERGREN G., 1947. — *Heterochromatic B-chromosomes in Anthoxanthum.* Hereditas, **33**: 261-296.
- PANDE S. K. and CHOPRA N., 1957a. — *Cytological studies in Indian mosses. I.* Jour. Ind. Bot. Soc., **38**: 241-247.
- 1957b. — *Cytological studies in some Indian mosses. II.* Jour. Ind. Bot. Soc., **38**.
- 1958. — *Cytological studies in Indian Mosses. III.* Nat. Inst. Sci. India, **24**(B, 2): 94-99.

* Not studied in original.

- SANNOMIYA M., 1957. — *Chromosome studies in Mosses II*. Jour. Hattori Bot. Lab., n. 11.
- SCHMIDT M., 1931. — *Experimentelle Analyse der Genom- und Plasmonwirkung bei Moosen. II*. Zeitsch. f. Induk. Abst. Vererb., **57**: 306-342.
- SHIMOTAMAI N. und KOYAMA Y., 1932 *. — *Geschlechtsschrosomosen bei Pogonatum instzum Lindb. und chrosomosenzahlen bei einen andern Laubmoosen*. Bot. Mag. Tokyo, **46**: 385-391.
- SHIMOTAMAI N. und KIMURA K., 1936. — *Geschlechtsschrosomosen bei zwei Laubmoosen*. Zeitsch. f. indukt. Abst. Vererb., **72**: 307-312.
- STEBBINS G. L., 1950. — *Variation and Evolution in Plants*. New York.
- STEERE W. C., 1954. — *Chromosome number and behaviour in arctic mosses*. Bot. Gaz., **116**: 93-133.
- STEERE W. C., ANDERSON L. E. and BRYAN V. S., 1954. — *Chromosome studies on Californian mosses*. Memoirs of the Torrey Botanical Club, **20**(4): 1-75.
- TATUNO S., 1941. — *Zytologische untersuchungen über die Lebermoose von Japan*. Jour. Sci. Hirosima Univ. Ser. B., **4**: 1-187.
- VAARAMA A., 1949. — *Meiosis in moss species of the family Grimmiaceae*. Portug. Act. Biol. Ser. A. R. B. Goldschmidt, Vol., 47-48.
- , 1950. — *Studies on chromosome numbers and certain meiotic features of several Finnish moss species*. Bot. Notiser, 239-256.
- , 1953a. — *Chromosome fragmentation and accessory chromosomes in Orthotrichum tenellum*. Hereditas, **39**: 305-316.
- , 1953b. — *Some chromosome numbers of Californian and Finnish moss species*. The Bryologist, **56**: 169-177.
- , 1954. — *Structure and behaviour of meiotic bivalents in Hedwigia ciliata*. Arch. Soc. Vanamo, **8**(2): 195-206.
- , 1955. — *On the characteristics of the spontaneous bivalent race of Funaria hygrometrica*. Arch. Soc. Vanamo, **9**: 395-400.
- , 1956. — *A contribution to the cytology of some mosses of the British Isles*. Irish Natu. Jour., **12**: 1-11.
- VANDERLYN L., 1949. — *The heterochromatin problem in cytogenetics as related to other branches of investigation*. Bot. Rev., **15**: 507-582.
- WEITSTEIN F. V., 1923. — *Kreuzungsversuch mit multiploiden Moosrassen*. Biol. Zentralblatt, **43**: 71-82.
- , 1924. — *Morphologie und Physiologie des Formwechsels der Moose auf genetischer Grundlage*. Zeits. Ind. Abst. Vererb., **33**: 1-230.
- , 1928. — *Experimentelle untersuchungen zum Artbildungsproblem*. Zeitsch. f. Induk. Abst. Vererb., **74**: 34-53.

* Not studied in original.

- ANO K., 1957a. — *Cytological studies on Japanese Mosses. I.* Mem. Fac. Education Niigata Univ., 6: 1-31.
- 1957b. — *Cytological Studies in Japanese Mosses. II.* Mem. Takada Branch, Niigata Univ., 1: 85-126.
- 1957c. — *Cytological Studies in Japanese Mosses. III.* Mem. Takada Branch, Niigata Univ., 1: 129-159.

EXPLANATION OF PLATES LXVIII-LXIX

PLATE LXVIII

- Dicranella mollicula*, $n = 14$. The two faintly staining (arrow marked) bodies in the centre are the disjoined heteromorphic «special bivalent». $\times 2800$.
- Symblepharis helicophylla*, $n = 14$ ($13 + m$), the minute bivalent is disjoined (arrow marked) in the centre. $\times 2400$.
- Microcampylopus* sp., $n = 13$. The large, «special bivalent» in the centre is in the process of disjunction. $\times 2400$.
- Anoetangium thomsonii*, $n = 13$, the large bivalent is at the upper periphery. $\times 2800$.
- Reimmersia inconspicua*, showing the peripheral location and the heteromorphic configuration of the large bivalent. $\times 2800$.

PLATE LXIX

- Timmiella anomala*, $n = 15$, the minute bivalent is lying at 7 o'clock. $\times 2400$.
- T. anomala*, the grouping of the bivalents at M-I, the minute bivalent is undergoing disjunction at 8 o'clock.
- Rhacomitrium favanicum*, $n = 14$. Note both the large and the minute bivalents. $\times 2400$.
- Philonotis turneriana*, $n = 6$. $\times 2400$.
- Leucodon secundus*, $n = 9$. The sex bivalent has disjoined into X and Y. $\times 2400$.
- Daltonia semitorta*, $n = 11$ ($10 + m$). $\times 2400$.

SUMMARY

1) Cytological studies have been carried out on the Himalayan mosses which has been an almost unexplored region till present. Special attention has been paid to the rocarpic mosses. 55 species and one variety representing 10 families have been investigated. Out of these the chromosome number for 49 species, 16 genera and one family

is reported for the first time. The chromosome numbers of all the investigated species are given in Table I.

2) A discussion pertaining to various features of individual genera brought out in the present study in comparison to that of other workers, whenever possible, is given at the end of each genus.

3) In *Symblepharis helicophylla* striking quantitative differences have been observed between the populations of higher (12,000) and lower (8,000-9,000) altitudes. These differences are not, however, correlated with the chromosome number but may be genic in nature. These are attributed to the selective influences of strong winds and more rigorous climatic conditions of the higher altitudes resulting in the general stuntedness of the former type. The two have been recognized as distinct varieties.

4) Stickiness and clumping of chromosomes has been found to be a general feature of the Himalayan mosses which is further increased by abnormal weather. This when more intensified leads to fragmentation and various other meiotic abnormalities which have been observed in *Dicranella spiralis*, *Anoetangium thomsonii*, *Leucodon secundus*, *Barbula flavescens* and *Ceratodon stenocarpus*. The details of the abnormal course of meiosis are discussed.

5) Heteromorphic bivalent representing sex chromosomes (the evidence being circumstantial) has been observed in *Leucodon secundus*, *Reimmersia inconspicua*, *Moldanobrya roylei*, *Barbula ehrenbergii*, *B. flavescens* and *Anoetangium thomsonii*. In addition to these sex bivalents, various other types of heterochromatic bivalents have also been observed. The large characteristic rod-shaped bivalent is met in all the Ditrichaceae, Pottiaceae (except *Timmiella anomala*) and Grimmiaceae; the «special bivalent» has been observed in various members of Dicranaceae, Leucobryaceae and Calymperaceae; the minute bivalent has been noticed in a very large number of mosses belonging to Ditrichaceae, Dicranaceae, Pottiaceae, Grimmiaceae and Hookeriaceae. The behavior and properties of these bivalents have been described.

6) A very remarkable feature of all the Haplolepidaceae investigated is the prevalence of 13 or 14 as the base number. It is interesting with respect to the situation in the higher northern latitudes where different numbers have been reported even within the same family. The original base number for these families has been considered to be 7, which is interpreted to be the secondary base number derived from 7.

7) Another equally important feature of the Himalayan mosses is the very low incidence of polyploidy, both in grade and frequency. Out of the present 55 mosses studied 49 are haploid, 4 diploid and one triploid. This offers a strong contrast to the situation in the higher latitudes.

8) Constancy of basic chromosome number, very low occurrence of polyploidy and aneuploidy, presence of some common karyological features in the different families are the criteria on the basis of which the conservancy of the Himalayan moss flora has been pointed out.

RIASSUNTO

Sono stati eseguiti studi citologici sui muschi Himalayani, fino ad oggi quasi sconosciuti sotto questo punto di vista. Sono stati curati in modo particolare i muschi acrocarpi. La ricerca è stata condotta su 55 specie e una varietà, comprese in 10 famiglie. I numeri cromosomici relativi a 49 specie, 16 generi e una famiglia sono comunicati per la prima volta. Nella Tabella I a pagina 560 sono inquadrati i numeri cromosomici di tutte le specie studiate.

Quando è stato possibile, alla fine di ciascun paragrafo riguardante un genere, è stata fatta seguire una discussione sulle varie caratteristiche, facendo delle comparazioni con i dati di altri AA.

In *Symblepharis helicophylla* sono state osservate differenze notevoli fra popolazioni altitudinali maggiori (3600 mt.) e minori (2400-2800 mt.). Queste differenze tuttavia non appaiono essere in relazione col numero cromosomico, ma sembrano essere di natura genetica; esse sono attribuite alla selezione operata dai forti venti e dalle più rigide condizioni climatiche, caratteristiche delle alte quote. Le sopradette popolazioni sono state considerate come formate da due distinte varietà.

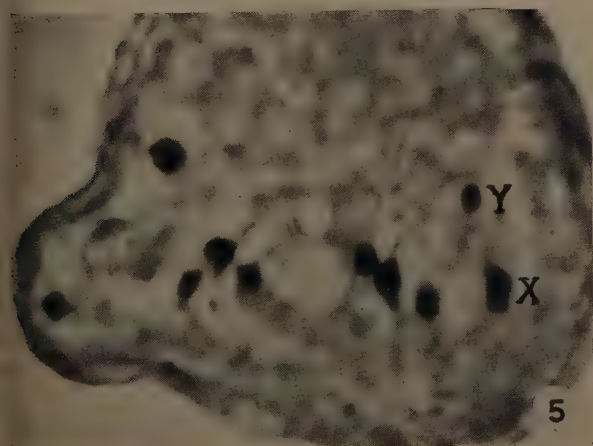
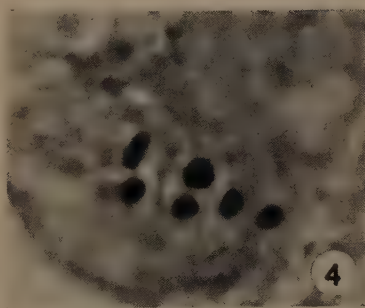
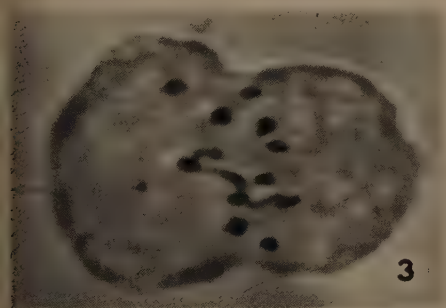
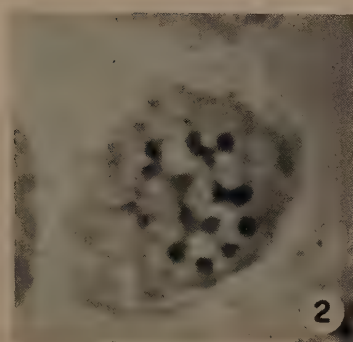
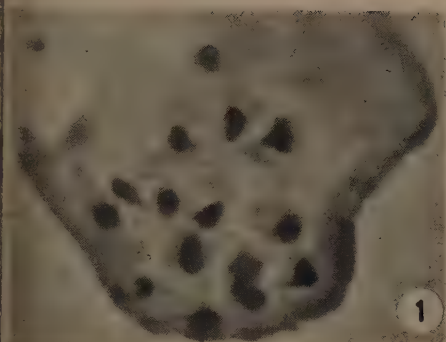
«Stickiness» e «clumping» son risultati essere fenomeni comuni a tutti i muschi Himalayani, accentuati dalle particolari condizioni climatiche. Talvolta si giunge anche alla frammentazione cromosomica e ad altre varie anomalie del processo meiotico, come è stato osservato in *Dicranella spiralis*, *Anoetangium thomsonii*, *Leucodon secundus*, *Barbula flavescens* e *Ceratodon stenocarpus*. Vengono presi in esame i particolari dei processi meiotici anormali.

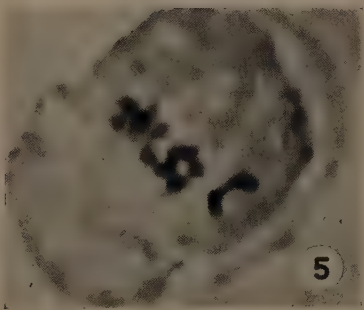
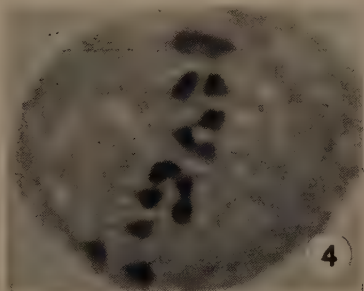
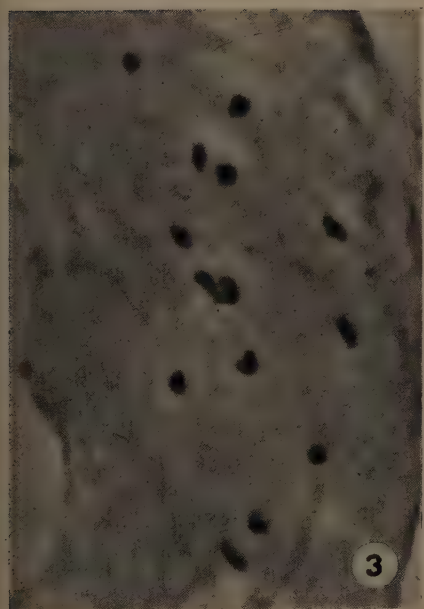
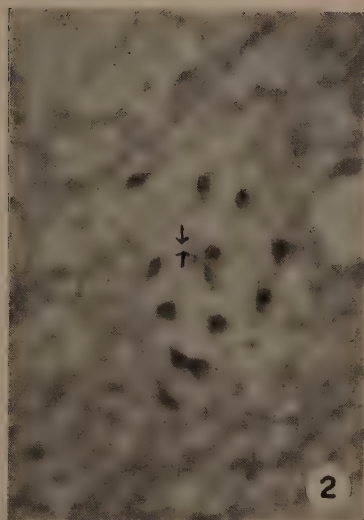
Un bivalente eteromorfo, interpretabile come coppia di cromosomi sessuali, è stato osservato in *Leucodon secundus*, *Reimmersia incospicua*, *Molendoo roylei*, *Barbula ehrenbergii*, *B. flavescens* e *Anoetangium thomsonii*. Oltre ai bivalenti sessuali sono stati osservati vari altri tipi di bivalenti eterocromatici. Un grosso bivalente dalla caratteristica forma allungata è stato visto in tutte le Ditrichaceae, in tutte le Pottiaceae (eccettuata *Grimmiella anomala*) e in tutte le Grammiaceae. Lo «special bivalent» è stato osservato in varie specie di Dicranaceae, Leucobryaceae e Calymperaceae. Un bivalente piccolissimo è stato riscontrato in moltissimi muschi appartenenti alle Ditrichaceae, Dicranaceae, Pottiaceae, Grimmiaceae e Hookeriaceae. Viene descritto il comportamento e le proprietà di questi bivalenti.

Una caratteristica assai notevole, comune a tutte le Haplolepideae studiate, è la prevalenza del numero base $x = 13$ o 14 . È interessante il confronto con la situazione trovata in latitudini più settentrionali, dove anche nell'ambito della stessa famiglia sono stati reperiti numeri differenti. Si deduce che il numero base di queste famiglie sia $x = 7$, che può essere guardato come numero base secondario, derivato da $x = 7$.

Un'altra importante caratteristica presentata dai muschi Himalayani è la bassissima incidenza della poliploidia, riguardo sia al grado sia alla frequenza. Delle 55 specie studiate, 49 sono risultate aploidi, 4 diploidi e una triploide. Questa situazione è assai diversa da quella presentata da muschi di latitudini più settentrionali.

La costanza del numero base, la bassissima incidenza della poliploidia e dell'aneuploidia, la presenza in diverse famiglie di alcuni caratteri cariologici comuni, possono dimostrare il carattere conservativo della flora muscinale Himalayana.





CYTOTAXONOMIC OBSERVATIONS ON SOME WEST HIMALAYAN PTERIDACEAE

by

P. N. MEHRA and S. C. VERMA

Department of Botany, Panjab University, Chandigarh-3, India

(with Plates LXX-LXXIV and 22 text-figures)

Received: 7th January 1960.

CONTENTS

INTRODUCTION	Page 619
MATERIAL AND METHODS	» 620
OBSERVATIONS	
<i>Pteridium</i>	» 621
<i>Hypolepis</i>	» 622
<i>Pteris</i>	» 624
<i>Coniogramme</i>	» 629
<i>Actiniopteris</i>	» 630
<i>Onychium</i>	» 633
<i>Anogramma</i>	» 633
<i>Adiantum</i>	» 635
SUMMARY AND CONCLUSIONS	» 641
ACKNOWLEDGEMENTS	» 645
REFERENCES	» 645
EXPLANATION TO PLATES	» 648
RIASSUNTO	» 649

INTRODUCTION

During the present decade several contributions have appeared regarding the cytological analysis of the fern floras of both temperate and tropical regions of the Northern as well as Southern hemispheres ⁽¹⁾. The need for a comparison of a similar data from a geographically subtro-

⁽¹⁾ For major works other than this laboratory, refer to MANTON (1950, 1953, 1954), MANTON and SLEDGE (1954), WAGNER (1955), WALKER (1957), BROWNLIE (1957, 1958).

pical area seems quite apparent particularly for the elucidation of involved problems of polyploidy in relation to latitude or geographical distribution of various taxa. Furthermore, the data on ferns so reported has stressed the necessity of a cytological enquiry for various species from as many different parts of their total range as possible to unfold the distribution patterns of the various taxa.

In the Asian continent, Himalayan range, being geologically recent origin, seems an intrinsically important area for such a study. A few cytological reports of some Himalayan ferns have already appeared in the past few years from this laboratory (cf. MEHRA et al. 1956a, 1956b, 1956c, 1957a, 1957b, 1957c, 1957d, 1958a, 1958b, 1959a, 1959b, 1959c, and VERMA 1956, 1957, 1958, 1959). The following account is a similar addition of cytological observations on some members of Pteridaceae (sensu COPELAND, 1947) mainly from the Mussoorie Hill with an emphasis on cytogeographic comparisons wherever possible.

In the Himalayas — in its Western range — Mussoorie proper is at 30.27° N, 78.6° E and at an altitude of 6,500 ft. The surrounding area ranging from an altitude of 2,000 ft. to 8,500 ft. has been explored for its fern vegetation. The area under consideration receives about 86-90 inches annual rainfall⁽²⁾ which is unequally distributed, most of which (67.06 inches) fall during the monsoons (July-September) — the growing period of ferns. During this period the average humidity is near the saturation point from 85-93.5 while the maximum and minimum temperatures vary between 67.96° F - 69.35° F and 57.8° F - 60.58° F respectively. This is followed by a dry period with scanty rain, low temperature, low humidity and snowfall (at Mussoorie level and above) and consequently the vegetation enters a dormant stage. Thus there exists a regular periodicity in the growth of the vegetation (especially ferns) at these altitudes. Comparatively at lower levels the climate is little warmer and less humid.

MATERIAL AND METHODS

There are available two complete accounts of the ferns of this region (cf. MEHRA, 1939 and STEWART, 1942). MEHRA has listed 23 species and

(2) Figures about rainfall, minimum and maximum temperatures and humidity represent the averages from 1951-1956 which were kindly supplied by the Regional Meteorological Centre, New Delhi.

the Pteridaceae while STEWART maintains 24 with the omission of two of Mehra's report and an addition of three more. Therefore, the total would come to 26, thirteen of which are included here. The materials of almost all the species dealt with were gathered during the monsoons in 1951 and in the subsequent years. In addition such species as are also available wild in the plains (Amritsar 31.37° N, 74.55° E and Meerut 29.1° N, 77.45° E) have been included for the sake of comparison. At places where cytological or cytogeographical discussions are attempted, unpublished data of the same or the related species from the Eastern Himalayas (Darjeeling 27.3° N, 88.16° E) has been incorporated.

Young as well as mature fertile pinnae were fixed in the field chiefly in 1:3 acetic alcohol. More often the acetic acid component was pre-saturated with iron acetate so as to increase the stainability of the chromosomes. The usual aceto-carminc squash preparations in all the cases were made within 15 days of the fixation as it became increasingly difficult beyond this period to get the mother cells out of the sporangia effectively. The data presented is based on permanent preparations prepared by MCCLINTOCK's (1929) method. Photomicrographs have only been taken where necessary while camera lucida drawings are offered for the rest of the preparations.

OBSERVATIONS

Pteridium. The sole representative of the genus *Pteridium*, *P. aquilinum* (L.) Kuhn ex Decken (commonly called Bracken) is cosmopolitan with inherent potentialities of wide climatic and edaphic tolerances, more often becoming a weed. TRYON (1941) from a careful study of all the variants has grouped them into ssp. *typicum* and *caudatum*. The total number of varieties recognized are twelve⁽³⁾, out of which only two — var. *wightianum* (Ag.) Tryon and var. *yarrabense* Domin — representing each ssp., are reported to occur in North India (cf. TRYON l. c.). In Mussoorie Himalayas only var. *wightianum* seems available and is very common on soil by the roadside from Dhanouti to Kaudia in open situations whereas towards Mussoorie it decreases considerably, a few plants occurring here and there in the forests (MEHRA, 1939). The haploid chromosome number comes out to be unequivocally 52

⁽³⁾ COPELAND (1947) and CHING (1940) would prefer to treat them under 5 or 6 or even more distinct species. The system of TRYON (1941) is followed here.

(Text-fig. 1) likewise reported for the typical plants from Britain, Madeira (MANTON, 1950), Malaya (MANTON, 1954), Ceylon (MANTON and SLEDGE, 1954); var. *latiusculum* (Desv.) Underw. (BRITTON, 1953) and var. *pseudocaudatum* (Clute) Heller (WAGNER, 1955) from North America; *P. esculentum* (Forst. f.) Diels (= *P. aquilinum* var. *esculentum* (Forst.) Kuhn from New Zealand (BROWNLIE, 1957). Such an extreme uniformity and conservatism of the gametic number from the temperate to the tropical latitudes perhaps signifies a climax of its cytologic evolutionary potential such as is observed in the genus *Equisetum* ($n = 108$, MANTON, 1950; $n = 108$, NINAN, 1955; MEHRA and BIR, 1959a) and members of Osmundaceae ($n = 22$, MANTON, l. c.). Further in all pr



Fig. 1: *Pteridium aquilinum* var. *wightianum* (Ag.) Tryon, $n = 52$, $\times 2500$ (4).

bability it seems that a wider distribution and differentiation at the subspecific as well as the varietal level (*sensu* Tryon l. c.) have appeared after the present ploidy level was attained.

Hypolepis. The genus is mainly pantropic, extending southward to S. Africa and New Zealand and northward to Japan and China. The only species that occurs at Mussoorie is the widely ranging *Hypolepis punctata* (Thumb.) Mett. It should, however, be made clear that MEHRA (1939) had referred earlier these plants as *H. hostilis* Presl giving reference of synonyms and figure (BEDDOME F. S. 1, 1863, t. 170) that were considered previously by CLARKE (1880) and BEDDOME (1892) under *Polypodium*.

(4) Figs. 1-9; 11-15; 18-22 showing chromosome counts at diakinesis or prometaphase.

podium rugosulum Lab. and *Phegopteris punctata* (Thunb. under *Polypodium*) respectively. Both were treated synonymous. Furthermore, these authors included *H. hostilis* Presl (at least to Hohenacker's Nilgherry plants) as one of the synonyms for *Phegopteris punctata*. CHRISTENSEN (1913, 1934) regards the two *Polypodium* species as distinct



Fig. 2: *Hypolepis punctata* (Thunb.) Mett., $n = 104$, $\times 2500$; (Explanation to Pl. LXX, Fig. 1).

and has shifted them to *Hypolepis* as *H. punctata* (Thunb.) Mett. and *H. rugosula* (Lab.) J. Sm. The latter has a limited range, mostly in temperate Australia and Montes tropical. *H. punctata* in the modern sense (cf. HOLTUM, 1954) has a pantropic distribution extending northwards to Japan, southwards to Australia and from Ceylon to the Pacific. It is, therefore, evident that both the segregates of the «original» *punctatum* occur in Australia. However, *H. hostilis* that has its distribution in Jamaica, Columbia, Peru and Brazil (cf. CHRISTENSEN,

1906) does not exist in Mussoorie. STEWART (l. c.) rightly referred the Mussoorie taxon to *Hypolepis punctata*.

All the gatherings made near Jumna Bridge (3,000-4,000 ft. altitude) possessed a regular meiosis resulting in 64 spores per sporangium and at late diakinesis 104 rather small bivalents (Plate LXX, Fig. Text-fig. 2) are always discernible which is, therefore, the gametic number for the present taxon. It may be added that Darjeeling populations of this species for which MEHRA and KHANNA (1959c) previously reported $n = c. 102$ show exactly the chromosome number of $n = 104$.

The first cytological report of the species was by MANTON and SLAUGHTER (1954) who reported it to be a species complex and described three chromosome races, diploid, $n = 51-53$ (from Hakgala, Ceylon); tetraploid, $n = c. 100$ (from Taiping hills, Malaya), and triploid sterile hybrid, $2n = c. 150$ (from Australia). Later MANTON (1954a) made a reference to the occurrence of the tetraploid race in Ceylon also and for the Malayan taxa offered $c. 104$ as the gametic number.

Pteridium ($x = 52$) has always been associated with *Paesia* and the latter with *Hypolepis* ($x = 52$). The recent report of BROWNLIE (l. c.) $n = 26$ in *Paesia* (*P. scaberula* « A. Rich. » Kuhn) has further strengthened such an affinity. MEHRA and KHANNA (1959) have already considered the naturalness of this alliance. It also provides additional evidence of the possible derivation of the monoploid number of the three genera from the base number 13. The occurrence of $n = 65$ in *Dicksonia squarrosa* Sw. and *D. fibrosa* Cl. (BROWNLIE l. c.) and the actual number $n =$ recorded by MANTON (1950) in *Hymenophyllum tunbridgense* (L.) S. from Scotland, both belonging to the marginales of BOWER (1926) are certainly very significant and may indicate a possible phylogenetic line of evolution based on this number.

Pteris. Five (6-STEWART, 1942) species are reported from this area, out of which *P. excelsa* Gaud. is rare. *Pteris vittata* L. (*P. longifolia* sensu Bedd. non Linn.) (Bedd. F. S. l. 183 t. 133 and F. B. l. 188 Fig. 55, p. 105) occurs at lower levels below 4,000 ft. usually along the dry slopes on gravelly soil. This fern is more often known as *P. longifolia* L. in Indian literature and is labelled as a synonym of *P. vittata* L. which it is not. The former is an allied species and native of tropical America. It differs considerably from *P. vittata* (cf. MORTON, 1957). In shady and moist localities the fronds become as long as four feet whereas the normal length ranges between 1-2 ft. All the collections made at Dehra Dun and further supplemented from plants growing in the

Botanic Gardens, Amritsar, Company Gardens, Amritsar, and Gandhi Gardens, Meerut, were found to be tetraploid with $n = 58$ (Pl. LXX, Fig. 2; Text-fig. 3). 64 normal and viable spores are produced in each sporangium. The sexual nature has also been ascertained from the gametophytes. The same grade of ploidy have earlier been assigned to the Ceylon taxa by MANTON and SLEDGE (l. c.). In none of materials studied any meiotic instability such as reported in a plant growing at Calcutta by SHARMA and MAZUMDAR (1955) was recorded.

The next interesting and variable species is *Pteris quadriaurita* (sensu lato), which is quite common in mesophytic and shady places,

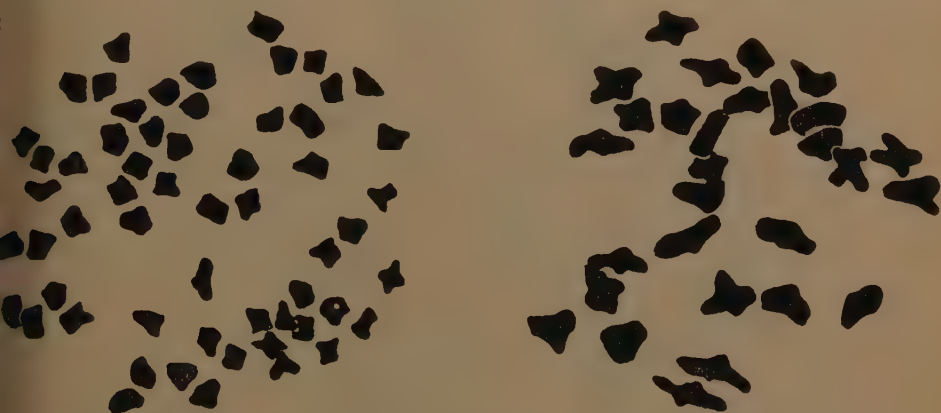


Fig. 3: *Pteris vittata* L., $n = 58$. $\times 1700$; (Explanation to Pl. LXX, Fig. 2).

Fig. 4: *Pteris quadriaurita* Retz. (sensu lato), $n = 29$, $\times 2500$.

ascending upto 8,000 ft. altitude. Out of the variants only one form has been sampled from various localities, viz. Mossy falls, Barlu Ganj, Amer Khet forests, and Park. All the gatherings are diploid sexual (varied from gametophytic generation) with $n = 29$ (Text-fig. 4). The rest of the complex of the whole of Northern India is being investigated by the junior author and would be presented later. It is pertinent to mention that MANTON and SLEDGE (l. c.) have also reported diploid forms of *Pteris quadriaurita* complex from Ceylon.

Pteris cretica L. is among the earliest known apogamous species (cf. DE BARY, 1878). The various Indian species that are allied to it are *P. ensiformis* Burm., *P. pellucida* Presl and *P. stenophylla* Wall. Out of these only the last mentioned is available in Mussoorie along with *P. cretica*. The latter is fairly common all along Mussoorie in meso-

phytic environments extending as far as Kaudia and is quite variable in its external appearance. Most of the forms so far gathered from Jammu Khet forest and Company Khud are apogamous, chiefly producing 8-celled sporangia, while no 16-celled sporangium has so far been observed. In the 8-celled sporangium at diakinesis unmistakable presence of 58 «bivalents» (Text-fig. 5) refers the plants to be diploid apogamous. The Darjeeling Himalayan gatherings are also diploid apogamous. The species is distributed in Mediterranean and eastwards to China and Japan. DE LITARDIERE (1921) has mentioned almost similar number (c.



Fig. 5: *Pteris cretica* L., « n » = 58, a diploid apogamous, $\times 2500$.

for the native European species from Italy and Corsica. Later the plants collected by MANTON in 1937 near the Western shore of Lake Maggiore (Italy) were also found to be diploid apogamous with « n » = 58 (MANTON, 1950). Thus the diploid apogamous form has a wide range of distribution from Europe to Eastern Himalayas. MANTON (l. c.) has also discovered tetraploid apogamous forms in some of the commercial varieties of *P. cretica* and has recently reported plants of the same type to occur in a wild state in the tropics of Uganda in Eastern Africa.

One of the related species to the above and native to this region is *P. stenophylla* Wall. (= *P. pellucida* Presl var. *stenophylla*, *P. distachya* Wall.) chiefly growing on calcareous gravelly soil along the banks

of streamlets where it is not uncommon, ascending upto 5500 ft. The fronds are usually subdigitate with three pinnae but fronds with only two pinnae or one pinna are also present attached to the same rhizome. Fronds are usually sub-dimorphic, the infertile ones being broader and shorter while the fertile ones are long and narrow. Cytological studies are based on the material collected from Mossyfalls and Company Khud and both these gatherings were found to be diploid sexual with 29 bivalents at diakinesis (Pl. LXXI, Fig. 3; Text-fig. 6). The same chromosome number was found in plants gathered at Dharamsala (32.16° N, 76.23° E) during May 1958.



Fig. 6: *Pteris stenophylla* Wall., $n = 29$, $\times 2000$; (Explanation to Pl. LXXI, Fig. 3).

Still another close relative of *P. cretica* L. was found growing wild near Rajpura in September 1955 by the junior author and was later identified by Dr. T. G. Walker (U. Leeds) through the courtesy of Prof. R. E. Holttum (Kew) as *Pteris multifida* Poir. The present material resembles exactly plate n. 40 on p. 113 of Vol. 3 of Lowe's (1857) « Ferns British and Exotic ». It is perhaps better known in cultivation as *P. serrulata* L. f. which is an older but illegitimate name for it. It is a wide ranging species native certainly to Japan and China. Prof. Holttum writes, « It is said to have been introduced to cultivation in Britain in 1770 ». In North America the fern has long been a species of horticultural interest and is perhaps the only best example which has become an escape and naturalised as evidenced by its wild occurrence in South-Eastern United States from North Carolina to Florida and Texas (cf.

JONES, 1955). JONES (l. c.) has further referred to the various reports of this fern in different regions of S. America as well as near about Central America. In China, however, it is perhaps the commonest fern in Central



Fig. 7: *Pteris multifida* Poir, $n = 58$, $\times 1700$; (Explanation to Pl. LXXI, Fig. 4)

China (cf. DE VOL, 1945). Thus it appears that the Indian example is another case of its becoming naturalised from cultivation. This view is further supported by the fact that there is no mention of this fern either in earlier taxonomic literature on Indian Ferns (cf. CLARKE, 1880; BEDDOME, 1892) or in the later ones (cf. MEHRA, 1939; STEWART, 1942). Being a close relative of *P. cretica*, cytologically too it is very interesting. It is in all probability a tetraploid sexual since there are 58 bivalent

Pl. LXXI, Fig. 4, Text-fig. 7) at diakinesis and 64 normal and viable spores are produced in each sporangium (Pl. LXXI, Fig. 5). Similar state of affairs were noticed in plants kept in cultivation at Gandhi Gardens, Meerut, in 1956 which were said to have been obtained from collections of G. E. Peuch (Rosery, Meerut) who had received them from Europe some 20 years ago. A proper discussion of the entire group of *Pteris cretica* in India would appear elsewhere.

Coniogramme. It is a genus of mesophytic and hygrophytic places. Various forms of *C. fraxinea* (sensu lato) were reported to occur in the



Fig. 8: *Coniogramme affinis* Hieron., $n = 30$, $\times 2000$.

area by the senior author (MEHRA, 1939). The form later identified as *C. affinis* Hieron. — a species quite common in Kangra Himalayas (cf. HELPE, 1954), Kumaon, and to some extent in Nepal (cf. ALSTON et al., 1956) — has only been investigated. Unequivocal counts of 30 valents (Text-fig. 8) have been made at late diakinesis. Normal meiosis results in 64 spores. Species with $n = 60$ occur both at Kew (wild origin unknown) and in Ceylon (cf. MANTON and SLEDGE, 1954) which were described tentatively as tetraploids. *C. affinis* is the first report of a naturally occurring wild diploid sexual species and its presence in the Himalayas seems significant. Monoploid number for the genus is positively 30.

Actiniopteris. The monotypic genus is not actually represented in the Mussoorie Hills but has been incidental to the studies during the author's visits to Meerut by the junior author where it was located growing in the hot dry crevices of a mosque. It is represented by *A. australis* (L. 1



Fig. 9: *Actiniopteris australis* (L. fl.) Link., «n» = 87, a triploid apogamete, $\times 2000$; (Explanation to Pl. LXXII, Fig. 6).

Link, commonly known as *A. radiata* (Konig) Link, primarily native to the hot dry regions of the tropics and subtropics. According to CLARKE (1880), CHRIST (1897), DIELS (1902) and COPELAND (1947) the distribution of the species would range from the dry regions of Ceylon and Burma over South India and Deccan to Arabia, Socotra and the Mascarene Islands, East Africa, South to Transvaal and from the Steppes of Sud

Angola, and Kalachari, but avoids the W. african forest regions. As in North India it has been reported to occur at the base of the N. W. Himalayas (0 — 2,000 ft. altitude) in Kumaon and W. Nepal in the crevices of hot rocks; rare in the plains as at Agra, Delhi, and Moradabad (cf. CLARKE l. c.) and downward in the hills of Mt. Abu (RAIZADA, 1954). Cytological fixations of the material were kindly made by Dr. Y. S. Murti (Meerut) during August-September 1956-1957. It is one of the most favourable materials and has yielded exceptionally clear meiotic

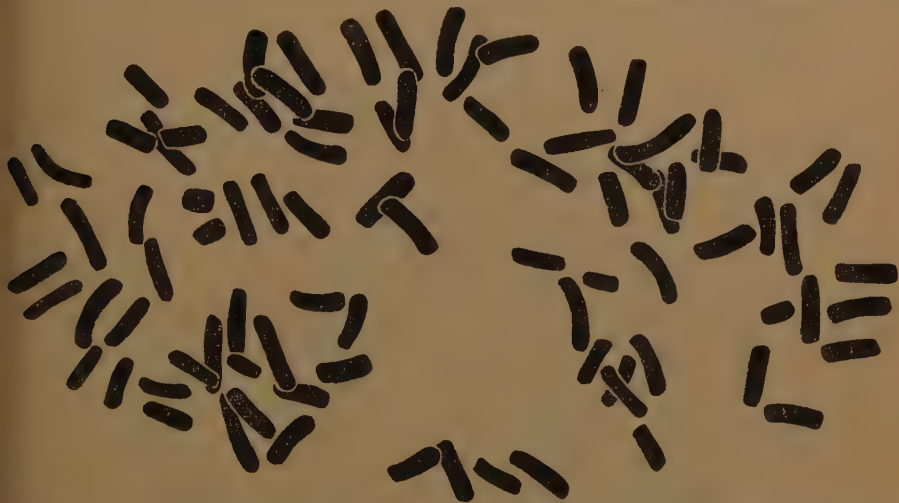


Fig. 10: Archesporial mitosis in the triploid apog. *Actiniopteris australis* showing $n = 87$, $\times 2000$.

and somatic preparations. The present taxon is apogamous yielding 32 well filled spores per sporangium. Counts of 87 « bivalents » at diakinesis (Pl. LXXII, Fig. 6; Text-fig. 9) and 87 chromosomes in an archesporial mitosis (Text-fig. 10) assign it to be a triploid apogamous. Unfortunately there has been no record of the occurrence of 16 celled sporangia during the course of this study and therefore they appear to be rare if at all present. The same level of ploidy and apogamous nature has also been observed earlier by MANTON and SLEDGE (1954) from Kenya (Africa). They have been able to analyse 16-celled sporangia which show 29 pairs and 29 univalents. Evidently the base number for the genus is 29 and involves at least two parents, one of which the tetraploid or diploid apogamous is itself of hybrid origin involving the second parent of the triploid. STOKEY (1948) was the first to report apogamy in the material

collected from the crevices of hot dry rocks in the ruins of an old fort near Vellore (S. India). During the course of investigation apogamous nature has also been determined for the material collected near Bombay by Dr. G. V. Joshi (Wilson College) and Kodai Kanal (S. India) by Dr. Y. S. Murty. It is of interest to add that in the field fixations of 1955 from Meerut some sickly looking individuals were found to possess 58 bivalents in a dividing 8-mother celled sporangium (Text-fig. 11). Further search for such diploid apogamous plants have so far not been



Fig. 11: *Actiniopteris australis*, a rare spore — mother cell with $n = 58$, $\times 2000$.

fruitful. However, it now seems certain that there is also a diploid sexual in the range of distribution of the species which has served as the second parent in the evolution of the triploid apogamous taxon.

Another point that deserves a little comment is STOKEY's (1934) attribution of its apogamous nature as an adaptation to xerophytic habitat. This argument does not seem to hold good in view of the fact that there are species both diploid and triploid apogamous which inhabit moist environments, and conversely normal sexually reproducing species occur which grow in dry habitats. It seems more logical to assume that once having evolved, the taxon possessed greater ability to withstand xeric conditions of life which well fitted with its apogamous behavior.

Onychium. *Onychium auratum* Kaulf. and *O. japonicum* (Thunb.) Kze. are the two species (STEWART, 1942, lists three) occurring here. The latter is exceedingly common on calcareous soil by the roadside from Mussoorie to Kaudia forming dense tufted beds, favouring exposed places but sometimes grows in shady and moist localities in Badraj forests. Chromosome studies on the Mussoorie taxa have already appeared along with other Indian species of the genus (MEHRA and VERMA, 1957d). The gametic number for *O. japonicum* is 29 (Pl. LXXII, Fig. 7; Text-fig. 12) which is also the base number for the genus. Last year plants from Naini



Fig. 12: *Onychium japonicum* (Thunb.) Kze., $n = 29$, $\times 2300$;

(Explanation to Pl. LXXII, Fig. 7).

Tal (29.23° N and 79.30° E) that are kept in cultivation in Gandhi Gardens, Meerut, were studied in addition. These are also diploid in genetic constitution with $n = 29$.

Anogramma. This interesting genus is represented here only by a single species *A. leptophylla* (L.) Link which has otherwise a wider distributional range in both the hemispheres (cf. CHRISTENSEN, 1906; TAGAWA, 1939) and also typifies the genus (cf. COPELAND, 1947). At Mussoorie it is met with commonly on ridges along the roadside or moist substratum associated with *Sewardiella tuberifera*, *Utricularia orbiculata* and protected over by *Selaginella chrysorrhizos* and mosses. One of the outstanding characteristics of this species is that it is an annual and is usually attached to the prothalli which grow singly or in patches. The prothalli perennate in winter by the formation of small white tubers. Comparatively it is a bit difficult cytological material. Meiosis as revealed by a large number of gatherings made chiefly at

the Tehri-Garhwal road and Park (6,500-7,000 ft. altitude) is perfectly regular resulting in 64 spores per sporangium. At late diakinesis early metaphase 56 (c. 57) bivalents are observed (Pl. LXXII, Figs. 8, Text-figs. 13, 14) but the possibility of its being increased by one in Pl. LXXII, Fig. 8; Text-fig. 13 is by no means ruled out. The preparations are not conclusive. Therefore, to ascertain the basic number for the genus it was desirable to supplement similar observations on the one other Indian species *A. microphylla* (Hk.) Diels. The latter has got a very restricted distribution as compared to *A. leptophylla*, being mainly



Fig. 13: *Anogramma leptophylla* (L.) Link, $n = c. 56-57$ (c. 56), $\times 2500$.

Fig. 14: *Anogramma leptophylla* (L.) Link, $n = c. 56$, $\times 2500$; (Explanation to Pl. LXXII, Figs. 8, 9).

represented from Himalayas to China (cf. CHRISTENSEN, 1906; TAGAWA, 1939). *Anogramma microphylla* has been sampled from the same very localities in the Darjeeling Himalayas as mentioned by CLARKE (1888) and BEDDOME (1892). Investigations have revealed unequivocally 58 bivalents (Pl. LXXIII, Figs. 10, 11; Text-fig. 15) in dividing spore mother cells of exceptional clarity. Meiosis is normal and results in 64 seemingly viable spores per sporangium. An approximate count of 116 chromosomes have been observed in leaf tip smears confirming the sexual nature of the species.

Before proceeding further it is pertinent to mention that in the other Indian works the species *A. microphylla* is described as if glabrous. In the Himalayan samples investigated, on both the surfaces of the ultimate

pinnules are present 2-3 celled hairs, with their uppermost cell glandular (Text-figs. 16, 17). These hairs are present mostly in relation to the vein but they are also dispersed on the laminar surface. The number is more on the lower surface.

Since the above two species were investigated BROWNLIE (1958) has worked out the populations of *Anogramme leptophylla* from New Zealand and has reported $n = 29$. This confirms the base number 29 for

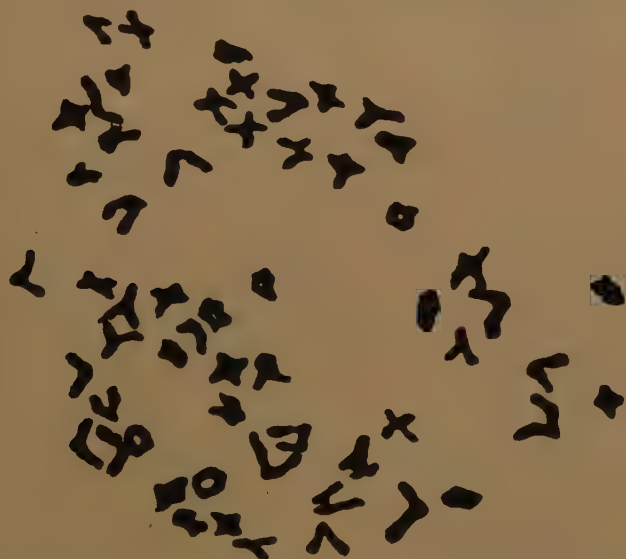


Fig. 15: *Anogramme microphylla* (Hk.) Diels, $n = 58$, $\times 2000$;
(Explanation to Pl. LXXIII, Fig. 11).

the genus and indicates that the two Himalayan species are tetraploid. *A. leptophylla*, therefore, exists in two cytological races, diploid in New Zealand and at the tetraploid level in W. Himalayas. COPELAND (1947) has suggested Antarctic origin for the genus on account of its wider distribution and representation in New Zealand. This seems to be supported by the occurrence of tetraploids in the Himalayas and should the species from other areas north of the New Zealand prove to have similar or higher polyploidy level there would be ample justification for COPELAND's view.

Adiantum. The genus is represented in the area by 4 distinct species five according to STEWART, 1942). *Adiantum capillus-veneris* L. is chiefly a plant of the temperate and subtropical parts of the world and

is confined to lower altitudes. It prefers gravelly soil and moist habitats descending down to the plains where it becomes quite common along the walls of wells and on the sides of small water channels. Cytological examination was primarily made from collections gathered from Company Khud, Mossyfalls, and Sansardhara. It is diploid sexual with $n=30$ (Text-fig. 18). Such results are also supplemented from both the wild and cultivated materials at Amritsar. The same degree of ploidy has also been referred by MANTON (1950) for the European (Ireland, Italy



Figs. 16, 17: Ventral face of pinnae of *Anogramma microphylla* showing glandular hairs both in the region of veins and the lamina. Fig. 16, $\times 50$ and Fig. 17, $\times 340$.

and Spain) and Ceylon Material (MANTON and SLEDGE, 1954) and SHARMA and MAZUMDAR (1956) for the wild plants at Calcutta. Similar results are obtained from plants collected in the Eastern Himalayas (Darjeeling). The great uniformity in its chromosomal constitution from the temperate to the tropics is indeed remarkable and is to be ascribed to the great ecological amplitude in its genic composition.

The other most interesting and graceful species that occurs at low

levels is *Adiantum lunulatum* Burm. ⁽⁵⁾, (commonly named as *A. philippense* L.) which is represented throughout the tropics of whole world. There is little variation observed among the plants growing near Dehra Dun. It is a triploid apomict with «*n*» = 90 based on the monoploid



Fig. 18: *Adiantum capillus-veneris* L., *n* = 30, × 2700.

number 30 (Pl. LXXIV, Fig. 12, Text-fig. 19). In addition to few 16 celled sporangia which form shrivelled spores, 8 celled sporangia have been observed in great majority which form 32 viable spores. Apogamous nature of the Dehra Dun taxon and a population from Sikkim has previously been described in detail by the senior author morphologically and cytologically (MEHRA, 1938, 1944). The «*n*» number was reported then

(5) The species has turned out to be a species complex comprising populations with different chromosomal constitution. The nomenclatural issues involved in this material will be discussed later by the junior author.

as 88 from sectioned material which very nearly falls with the exact count of 90 made here from squashes. The interest lies only in the extreme cytological uniformity of the species distributed in the Western Himalayas. In contrast to this, the species is morphologically very variable in the Eastern Himalayas and it has been possible to analyse tentatively the cytological basis of the various phenotypic variations.



Fig. 19: *Adiantum lunulatum* Burm., $n = 90$, a triploid apogamous, $\times 2500$
(Explanation to Pl. LXXIV, Fig. 12).

It may, however, be stated in general that the triploid apogamous forms are the commonest and other cytological races amongst which is a diploid sexual are less common. The plant has also been examined from other parts of its range of distribution. Those collected at Lonavla in Bombay state by Dr. G. V. Joshi in 1957 are very similar to those of Dehra Dun and are triploid apomicts. At Mt. Abu (24.40° N, 72.45° E) on all the populations have been found to be triploid apogamous. MANN and SLEDGE (1954) have also reported only the triploid apogamous both from Ceylon and South Africa which, evidently, points to a wider range of the triploids from Himalayas to the tropics and farther to South Africa. In contrast to *Adiantum capillus-veneris* here it is the polyploid that seems to possess wider ecological amplitude and distribution.

The third species that occurs at lower levels belongs to the *Adiantum caudatum* L. complex. The Mussoorie taxon differs from the description given by HOLTUM (1954) and his Fig. 351 p. 601 in «Ferns of Malaya», in not having its veins raised and prominent, in colour, general appearance, texture, degree of cutting of the pinnae, and having smooth apices of the sterile pinnae. Sori in the present case are also large. The taxon, however, is the same as illustrated in BEDDOME's F. I., 1863, t. 2. and Fig. 44, p. 85 (BEDDOME, 1883) under *A. caudatum* L. Almost all the Indian works cite these illustrations for *A. caudatum*. In view of the above differences the plants were sent for identification to the late Mr. A. H. G. Alston (British Museum) who labelled them as *Adiantum incisum* Forsk. It was, however, considered synonymous with *A. caudatum* till recently when ALSTON and BONNER (1956) applied this name to the collections of Zimmermann from Nepal made in 1952 and 1954. Recently PICHI-SERMOLLI (1957) while discussing the ferns of Ethiopia has split the old species *Adiantum caudatum* and recognised *A. incisum* as a distinct member of *A. caudatum* complex. As it appears, all the previous references in the Indian literature of *A. caudatum* L. refer in fact to *A. incisum*. The species is exceedingly common in Mussoorie Hills below 4,000 ft., which is its uppermost limit. It grows abundantly on ridges at Dehra Dun, Rajpura, and on road from Kempty Falls to Jumna Bridge forming low growing mats. Adventitious buds commonly develop at the apex of the fronds, giving rise to new individuals. The species has been sampled from the material collected near Rajpura, Sansardhara, Dehra Dun, and on road to Kempty falls. Cytologically the species is uniform and is diploid sexual with $n = 30$ (Pl. XXIV, Fig. 13; Text-fig. 20). Since it is a close relative of *A. caudatum*

in which both tetraploid sexual and triploid apog. races have been observed (cf. MANTON and SLEDGE, 1954) it was thought worth while to study it cytologically from various localities of Eastern Himalayas (Pl. LXXII Fig. 14), Pathankot, Amritsar and Meerut. The last two localities provided only the cultivated material. It has revealed that throughout the N. Indian region the species is diploid sexual. It may also be stated here that the report of a diploid sexual taxon of *Adiantum caudatum* at PATNA by ROY and SINHA (1957) in reality concerns *A. incisum* Forsk.



Fig. 20: *Adiantum incisum* Forsk., $n = 30$, (Mussoorie), $\times 2400$; (Explanation Pl. LXXIV, Fig. 13).

Fig. 21: *Adiantum venustum* Don, $n = 60$, $\times 2000$.

This has been found to be the case from the plants supplied by Dr. Roy on which he had made the investigations.

The only species at higher levels is *Adiantum venustum* Don and is common from 6,000-9,000 ft. altitude growing in mesophytic situations. Both the collections from Jamerkhet forest and Park are cytologically alike. At late diakinesis 60 bivalents (Text-fig. 21) have invariably been observed and 64 normal spores are produced in each sporangium. Hence it is a tetraploid sexual based on number 30.

The only other incidence of a fern that has escaped cultivation and

belongs to Pteridaceae is *Adiantum tenerum* Sw. It is a native of Mexico, West Indian Islands, and Southward to Juan Fernandez and Peru (cf. BLATTER et D'ALMEIDA, 1922). A few individuals were located near Rajpura growing in a shady place and later identified as such by Dr. S. K. Mukerji (Botanical Gardens, Calcutta). Further collections and fixations have been made by Dr. G. V. Joshi from wild plants growing on walls in Bombay. In addition, the cultivated material at Rovery, Meerut have also been studied. All the materials irrespective of localities are cytologically identical with $n = 30$ (Text-fig. 22). The species is diploid sexual with 64 spores per sporangium.



Fig. 22: *Adiantum tenerum* Sw., $n = 30$, $\times 2000$.

SUMMARY AND CONCLUSIONS

Chromosome determinations are made for 17 species of Pteridaceae (sensu Copeland) of which 15 belong to Mussoorie area in the Western Himalayas. This also includes two escapes from cultivation namely: *Pteris multifida* Poir and *Adiantum tenerum* Sw. Some of the interesting Mussoorie taxa are also studied from other parts of their range. The results are summarised in Table I. All the species are sexual except where otherwise mentioned.

Pteridium has probably reached its evolutionary cytological climax as evidenced by its extreme conservatism of the gametic number ($n = 2$) from its varied habitats. The varietal and subspecific differences have most likely appeared after the attainment of the present grade of ploidy in biotypic variations and subsequent isolation.

TABLE I

Summary of chromosome numbers.

Species name	Source	Spores per sporangium	n-chromosome number	Ploidy level	Base number
1. <i>Pteridium aquilinum</i> (L.) Kuhn ex Deeken var. <i>wightianum</i> (Ag.) Tryon	Mussoorie	64	52	Diploid (Octoploid)	52 (13)
2. <i>Hypolepis punctata</i> (Thunb.) Mett.	Mussoorie Darjeeling	64 64	104 104	Tetraploid (16 ploid)	52 (13)
3. <i>Pteris vittata</i> L.	Mussoorie Amritsar (cult.) Meerut (cult.)	64 64 64	58 58 58	Tetraploid Tetraploid Tetraploid	29 29 29
4. <i>P. quadriaurita</i> Reiz. (sensu lato)	Mussoorie	64	29	Diploid	29
5. <i>P. cretica</i> L.	Mussoorie Darjeeling	32 32	58 58	Diploid « apog. » Diploid « apog. »	29 29
6. <i>P. stenophylla</i> Wall.	Mussoorie Dharamsala	64 64	29 29	Diploid Diploid	29 29
7. <i>P. multifida</i> Polr	Mussoorie Meerut (cult.)	64 64	58 58	Tetraploid Tetraploid	29 29
8. <i>Coniogramme affinis</i> Hieron.	Mussoorie	64	30	Diploid	30

11. <i>Anogramma leptophylla</i> (L.) Link	Naini Tal	64	29	Diploid	29
12. <i>A. microphylla</i> (Hk.) Diels	Mussoorie	64	c. 56-57	Tetraploid	29
13. <i>Adiantum capillus-veneris</i> L.	Darjeeling	64	58	Tetraploid	29
	Mussoorie	64	30	Diploid	30
	Amritsar	64	30	Diploid	30
	Amritsar (cult.)	64	30	Diploid	30
	Meerut (cult.)	64	30	Diploid	30
	Darjeeling	64	30	Diploid	30
14. <i>A. lunulatum</i> Burm.	Mussoorie	32	90	Triploid « apog. »	30
	Darjeeling	32	90	Triploid « apog. »	30
	Bombay	32	90	Triploid « apog. »	30
	Mt. Abu	32	90	Triploid « apog. »	30
15. <i>A. incisum</i> Forsk.	Mussoorie	64	30	Diploid	30
	Darjeeling	64	30	Diploid	30
	Pathankot	64	30	Diploid	30
	Amritsar (cult.)	64	30	Diploid	30
	Meerut (cult.)	64	30	Diploid	30
16. <i>A. venustum</i> Don	Mussoorie	64	60	Tetraploid	30
17. <i>A. tenerum</i> Sw.	Mussoorie	64	30	Diploid	30
	Bombay	64	30	Diploid	30

Hypolepis punctata (Thunb.) Mett. is an interesting material for future cytogeographic investigation. The species is widely distributed and occurs in three cytological races. Diploids occur in Ceylon, tetraploids in Himalayas, Ceylon and Malaya, and triploids in Australia. The species and the many closely allied taxa occur in New Zealand which await cytological scrutiny to bear upon the view of the Antarctic origin of the genus suggested by COPELAND (1939) and to follow the migration routes of the various cyto-taxa during their evolutionary history. Taxonomically all these races have been treated so far as one species.

The naturalness of the assemblage of *Pteridium*, *Paesia* and *Hypolepis* as pointed out earlier by MEHRA and KHANNA (1959c) on cytological grounds is re-emphasised. Morphologically, however, *Hypolepis* is known to possess a good deal in common in several essential characters with *Paesia* and *Pteridium* and also other members of the tribe Lonchitideae of CHING (1940). It is further suggested that remote relationship with Dicksoniaceae and Hymenophyllaceae is indicated on cytological evidence and the ultimate base number for the entire evolutionary series may be 13.

Among the species of *Pteris*, the report of a diploid sexual species *P. stenophylla*, and a tetraploid sexual *P. multifida* are very significant. These are the close relatives of the well known *Pteris cretica* and would be used later for experimental study of the entire *cretica* complex growing in nature for the involved problems of apogamy.

The occurrence of a diploid apogamous form (though rare) in the monotypic genus *Actiniopteris* has revived the interest for further investigation. The bulk of the material is triploid and has a wide range of distribution from South and East Africa through Arabia to South India, Burma and Ceylon. Furthermore it is held that its apogamous nature is not an adaptation to xerophytic habitat as suggested by STOKES (1948) but the taxon having evolved possessed greater potentialities to withstand xeric conditions which well fitted with its apogamous behaviour.

Anogramma leptophylla is another interesting material for study. It occurs in two cytological races, diploid in New Zealand and tetraploid in W. Himalayas. The species has a wide range of distribution and investigations from Northern latitudes would throw light as to how far the cytology explains the Antarctic origin of the genus postulated by COPELAND. Present limited data seems to be in favour of the

new. The only other Indian species, *A. microphylla* is also tetraploid ($n = 58$).

Adiantum as a whole is an absorbing genus. *Adiantum lunulatum* is polymorphic and the widely distributed taxon is a triploid apomict. A triploid sexual form of the complex occurs in the Eastern Himalayas. The entire complex is under investigation by the junior author and will appear in due course.

The report of diploid race in *A. caudatum* by ROY and SINHA (1957) is actually for a distinct but allied species *A. incisum*. Therefore, the triploid sexual form of the polymorphic species *A. caudatum* of which the triploid apogamous and tetraploid sexual are known from Ceylon (MANTON and SLEDGE, 1954) is still to be discovered.

Wherever possible, the geographic distribution of the various chromosome races for particular species have been mentioned in the text. It is concluded that potentialities for attaining a wider distribution are met with both in the diploids as well as the polyploids.

ACKNOWLEDGEMENTS

Grateful thanks are due to Prof. V. Puri (Meerut) for laboratory facilities to the junior author while he was at Meerut, to Dr. Y. S. Murty and Dr. G. V. Joshi for some fixed as well as pressed material, to Prof. R. E. Holttum, Mr. F. Ballard, the late Mr. A. H. G. Alston and Dr. S. K. Mukerjee for help in the identification, to Mr. G. E. Peuch for an easy access to his fern house at Meerut, to Dr. V. M. Sawhney for preparation of some slides, and to Mr. R. S. Pathania for taking the photomicrographs illustrating the paper.

REFERENCES

- ALSTON A. H. G. and BONNER C. E. B., 1956. — *Resultats des expéditions scientifiques genevoises au Nepal en 1952 et 1954. (Partie botanique)* 5: *Pteridophyta*. Candollea, **15**: 193-220.
- DE BARY A., 1878 *. — *Über apogame Farne u. die Erscheinung der Apogamie im Allgemeinen*. Bot. Ztg., **36**: 450-495.
- REDDOME R. H., 1863. — *Ferns of Southern India*. Gantz Brothers, Madras.
- , 1883. — *Ferns of British India, Ceylon and the Malaya Peninsula*. Thacker Spink & Co., Calcutta.

- BEDDOME R. H., 1892. — *Handbook to the Ferns of British India, Ceylon and Mald Peninsula (with Suppl.)*. Thacker Spink & Co., Calcutta.
- BLATTER E. and d'ALMEIDA J. F., 1922. — *Ferns of Bombay*. Bombay.
- BOWER F. O., 1926. — *The Ferns*. Vol. II. Cambridge Univ. Press.
- BRITTON D. M., 1953. — *Chromosome studies on ferns*. Amer. Jour. Bot., **40**: 575-583.
- BROWNLIE G., 1957. — *Cytotaxonomic studies on New Zealand Pteridaceae*. New Phytol. **56**: 207-209.
- , 1958. — *Chromosome number in New Zealand Ferns*. Trans. Roy. Soc. N. Z., **2**: 213-216.
- CHING R. C., 1940. — *On natural classification of the family Polypodiaceae*. Sunyatsen Univ. **5**: 201-268.
- CHRIST H., 1897*. — *Die Farn Krauter der Erde*. Jena.
- CHRISTENSEN C., 1906. — *Index Filicum*. Hafniae.
- , 1913. — *Index Filicum*. Supplementum 1906-1912. Hafniae.
- , 1934. — *Index Filicum*. Suppl. Tertium. Hafniae.
- CLARKE C. B., 1880. — *A review of the ferns of Northern India*. Trans. Linn. Soc. London. Second Ser., **1**: 425-611.
- COPELAND E. B., 1939. — *Fern evolution in Antartica*. Philippine Jour. Sci., **70**: 157-161.
- , 1947. — *Genera Filicum*. Chron. Bot. Publ. Walth. Mass.
- DIELS L., 1902*. — *Polypodiaceae* in: Engler and Prantl's *Natürlichen Pflanzenfamilien*. Leipzig.
- HOLTUM R. E., 1947. — *A revised classification of leptosporangiate ferns*. Jour. Linn. Soc. (Bot.), **53**: 123-158.
- , 1954. — *Flora of Malaya, II: Ferns*. Singapore.
- JONES G. N., 1955. — *The occurrence of Pteris multifida in the United States*. Amer. Fern. Jour., **45**: 107-113.
- DE LITARDIERE R., 1921*. — *Recherches sur l'element chromosomique dans la caryocinese somatique dans Filicinaes*. La Cellule, **31**: 255-273.
- LOWE E. J., 1857. — *Ferns British and Exotic*. Vol. III. London.
- MANTON I., 1950. — *Problems of cytology and evolution in the Pteridophyta*. Cambridge Univ. Press.
- , 1953. — *The cytological evolution of the fern flora of Ceylon*. Symp. Soc. Exp. Biol. N. 7, Evolution, pp. 174-185.
- , 1954. — *Cytological notes on one hundred species of Malayan Ferns*. Appendix to Holtum R. E., 1954. *Flora of Malaya, II: Ferns*, pp. 623-643.
- MANTON I. and SLEDGE W. A., 1954. — *Observations on the cytology and taxonomy of the Pteridophytic Flora of Ceylon*. Phil. Trans. Roy. Soc. (London) Ser. B., **238**: 121-185.

- McCLINTOCK B., 1929. — A method for making acetocarmine smears permanent. *Stain Tech.*, **4**: 53-56.
- MEHRA P. N., 1938. — *Apogamy in Adiantum lunulatum* Burm. Part. I (Morphological). *Proc. Ind. Acad. Sci.*, B, **8**: 202-210.
- , 1939. — *Ferns of Mussoorie*. The Univ. Panjab, Lahore.
- , 1944. — *Cytological investigation of apogamy in Adiantum lunulatum*. *Proc. Nat. Acad. Sci. B*, **14**: 189-204.
- MEHRA P. N. and BIR S. S., 1957a. — *Cytology of some Indian species of genus Asplenium* L. *Curr. Sci.*, **26**: 151-152.
- , 1958a. — *Cytology of some Blechnoid ferns together with a note on the affinities of Stenochlaena*. *Proc. Nat. Inst. Sci.*, **24**, B: 47-53.
- , 1959a. — *A note on chromosome numbers in some Indian species of Equisetum*. *Amer. Fern Jour.*, **49**: 86-92.
- , 1959b. — *Cytology of Asplenium cheilosorum*. *Cytologia*, **24**: (in press).
- MEHRA P. N. and KHANNA K. R., 1959c. — *Cytology of some Himalayan ferns*. *Jour. Genetics*, **56**: 1-14.
- MEHRA P. N. and LOYAL D. S., 1956a. — *Colchicine effect on the prothalli of Goniopteris multineata* (Wall.) Bedd. and *G. prolifera* (Roxb.) with emphasis on abnormal spermatogenesis in polyploid prothalli. *Ann. Bot. N. S.*, **21**: 544-552.
- , 1956b. — *Some observations on the cytology and anatomy of Hypodematium crenatum* (Forsk.) Kuhn. *Curr. Sci.*, **25**: 363-364.
- , 1958b. — *Chromosome number of Marsilea*. *Nature*, **181**: 577.
- MEHRA P. N. and SINGH G., 1956c. — *Cytology of Indian Gleicheniaceae*. *Curr. Sci.*, **25**: 168.
- , 1957b. — *Cytology of Hymenophyllaceae*. *Jour. Genetics*, **55**: 379-393.
- MEHRA P. N. and SINGH H. P., 1955. — *Cytology of Cyatheaaceae, Woodsiae and Marattiaceae*. *Curr. Sci.*, **24**: 425.
- MEHRA P. N. and VERMA S. C., 1957c. — *The cytology of some Athyrium species from Northern India*. *Ann. Bot. N. S.*, **21**: 455-459.
- , 1957d. — *Cytology of Indian species of Onychium*. *Nature*, **180**: 715-716.
- MORTON C. V., 1957. — *Observations on cultivated ferns. I*. *Amer. Fern Jour.*, **47**: 7-14.
- NINAN C. A., 1955. — *Cytology of Equisetum debile* Roxb. *Jour. Ind. Bot. Soc.*, **34**: 112-115.
- PICHI-SERMOLLI R. E. G., 1957. — *Adumbratio Florae Aethiopicae. 5: Parkeriaceae, Adiantaceae, Vittariaceae*. *Webbia*, **12**: 645-703.
- RAIZADA M. B., 1954. — *A botanical visit to Mt. Abu*. *Indian Forester*, **80**: 207-218.
- ROY R. P. and SINHA B. M. B., 1957. — *Chromosome types in Adiantum caudatum*. *Curr. Sci.*, **26**: 322-323.
- SCHELPE E. A. C., 1954. — *Ecological observations on Pteridophyta in the Kangra Himalaya*. *Amer. Fern Jour.*, **44**: 49-65.

- SHARMA A. K. and (Miss) MAZUMDAR ARTI, 1955. — *Cytological peculiarity of Pteris latifolia and its importance in evolution*. Sci. & Cult., **21**: 338-339.
- , 1956. — *Karyotypic variation in Pteridophyta and their significance*. Agron. Russ. **18**: 243-249.
- STEWART R. R., 1942. — *Ferns of Mussoorie and Dehra Dun*. In: 150th Annual Volume: Roy. Bot. Gardens, Calcutta.
- STOKEY A. G., 1948. — *The gametophyte of Actiniopteris australis (L. fil.) Link.* Jour. Ind. Bot. Soc., **27**: 40-49.
- TAGAWA M., 1939. — *Gymnogramme of Japan, Korea and Formosa*. Jour. Jap. Bot., **1**: 421-433.
- TRYON R. M., 1941. — *Revision of the genus Pteridium*. Rhodora, **43**: 1-31; 37-67.
- VERMA S. C., 1956. — *Cytology of Ophioglossum*. Curr. Sci., **25**: 398-399.
- , 1957. — *Cytology of Ophioglossum coriaceum A. Cunn.* Cytologia, **22**: 393-403.
- , 1958. — *Cytology of fern genus Acrophorus*. Curr. Sci., **27**: 177-178.
- , 1959. — *Basic chromosome number of Pteris*. Curr. Sci., **28**: 299-300.
- DE VOL C. E., 1945 *. — *Ferns and Fern allies of East Central China*. Shanghai.
- WAGNER W. H., 1955. — *Cytotaxonomic observations on North American Ferns*. Rhodora, **57**: 219-240.
- WALKER S., 1957. — *Cytogenetic studies in the Dryopteris spinulosa complex. I.* Watsonia, **3**: 193-209.

* Not studied in original.

EXPLANATION TO PLATES LXX-LXXIV

PLATE LXX

Fig. 1: *Hypolepis punctata* (Thunb.) Mett., $n = 104$, $\times 1200$; for explanatory diagram see Text-fig. 2. — Fig. 2: *Pteris vittata* L., $n = 58$, $\times 1700$; for explanatory diagram see Text-fig. 3.

PLATE LXXI

Fig. 3: *Pteris stenophylla* Wall., $n = 29$, $\times 2000$; for explanatory diagram see Text-fig. 6. — Fig. 4: *Pteris multifida* Poir., $n = 58$, $\times 1000$; for explanatory diagram see Text-fig. 7. — Fig. 5: A mature sporangium of *Pteris multifida* releasing 64 tetrahedral spores, $\times 140$.

PLATE LXXII

Fig. 6: *Actiniopteris australis* L. (fil.) Link, $\langle n \rangle = 87$, an apogamous triploid $\times 1000$; for explanatory diagram see Text-fig. 9. — Fig. 7: *Onychium japonicum*

(Thunb.) Kze., $n = 29$, $\times 2300$; for explanatory diagram see Text-fig. 12. — Figs. 8, 9: *Anogramma leptophylla* (L.) Link, Fig. 8: $n = c. 56-57$, $\times 2500$; for explanatory diagram see Text-fig. 13. Fig. 9: $n = c. 56$, $\times 2500$; for explanatory figure see Text-fig. 14.

PLATE LXXIII

Figs. 10, 11: *Anogramma microphylla* (Hk.) Diels, $n = 58$. Fig. 10: $\times 1350$. Fig. 11: $\times 1200$; for explanatory diagram see Text-fig. 15.

PLATE LXXIV

Fig. 12: *Adiantum lunulatum* Burm., « n » = 90, an apogamous triploid, $\times 1000$; for explanatory figure see Text-fig. 19. — Figs. 13, 14: *Adiantum incisum* Forsk., $n = 30$. Fig. 13: $\times 2400$; from Mussoorie, for explanatory diagram see Text-fig. 20. Fig. 14: $\times 1000$, from Teesta, Darjeeling.

RIASSUNTO

È stato determinato il numero cromosomico di 17 specie di Pteridaceae (*sensu* Copeland), di cui 15 provenienti dalla regione di Mussoorie nell'Himalaya occidentale; alcuni taxa interessanti questa regione sono stati studiati anche di altre provenienze; due sono sfuggiti alla coltura (*Pteris multifida* Poir e *Adiantum tenerum* Sw.). I risultati sono riassunti nella tabella a pag. 642. Tutte le specie sono a riproduzione sessuata, almeno che non sia diversamente indicato.

Pteridium ha probabilmente raggiunto il suo clima evolutivo citologico, come è dimostrato dalla sua estrema persistenza del suo numero gametico ($n = 52$) in tutto il suo ampio areale. Le differenze varietali e subspecifiche molto probabilmente si sono stabilite dopo il raggiungimento del suo attuale grado di ploidia.

Hypolepis punctata (Thunb.) Mett., è un materiale interessante per future ricerche citogeografiche. La specie è largamente distribuita e si presenta con tre razze citologiche. Quella diploide vive a Ceylon, quella tetraploide nell'Himalaya, a Ceylon e in Malesia, quella triploide in Australia. Tanto la specie quanto molti taxa strettamente affini vivono in Nuova Zelanda, e attendono l'analisi citologica per il sostegno dell'ipotesi dell'origine antartica del genere sostenuta da COPELAND (1939) e per individuare le vie di migrazione dei vari taxa citologici durante la loro storia evolutiva.

È confermato il naturale avvicinamento su basi citologiche di *Pteridium*, *Paesia* e *Hypolepis*, già suggerito da MEHRA e KHANNA (1959c). Morfologicamente tuttavia, *Hypolepis* possiede una buona dose di caratteri essenziali in comune con *Paesia* e *Pteridium* con altri membri della tribù delle Lonchitideae di CHING (1940). Inoltre si pensa che una remota affinità con le Dicksoniaceae e le Hymenophyllaceae sia indicata dai dati

citologici e che il numero base fondamentale dell'intera serie evolutiva possa essere definitiva il numero 13.

Fra le specie di *Pteris*, i reperti di una specie diploide sessuata, *P. stenophylla* e di una specie tetraploide sessuata, *P. multifida*, sono molto significativi. Essi sono strettamente correlati con la ben nota *Pteris cretica*, e potrebbero essere usati per successivi studi sperimentali sull'intero complesso di *cretica* crescente in natura e sui problemi sull'apogamia che esso coinvolge.

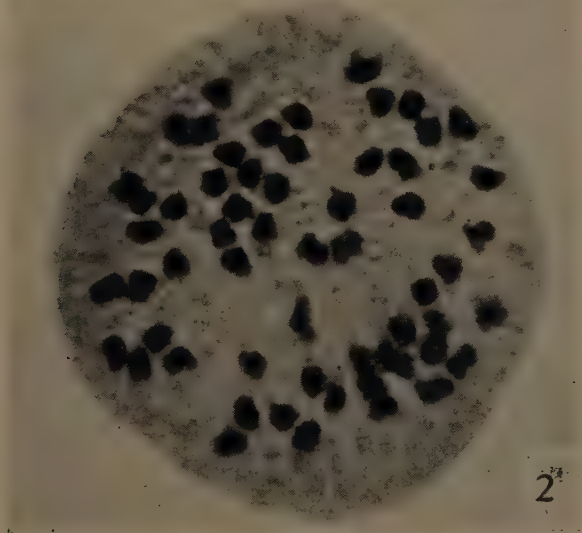
La presenza benchè rara, di una forma diploide apogama nel genere monotipico *Actiniopteris* ravviva l'interesse per ulteriori ricerche. La massa del materiale è triploide e ha una vasta area distributiva dall'Africa australe e orientale attraverso l'Arabia all'India meridionale, la Birmania e Ceylon. Pertanto si afferma che la sua natura apogama non è un adattamento all'habitat xerofitico, come ha suggerito STOKES (1948), piuttosto che il taxon si è evoluto essendo in possesso delle maggiori potenzialità a sopportare le condizioni xeriche che erano ben adatte al suo comportamento apogamo.

Anogramma leptophylla è un altro interessante materiale di ricerca. Si presenta in due razze citologiche, una diploide in Nuova Zelanda, e una tetraploide nell'Himalaya occidentale. La specie è largamente distribuita e ricerche condotte fin dalle latitudini polari boreali dovrebbero portare a chiarire se la citologia può spiegare l'origine antartica del genere postulata da COPELAND. Gli attuali dati, benchè limitati, sembrerebbero favorevoli a questa ipotesi. La sola altra specie indiana, *A. microphylla*, è anch'essa tetraploide ($n = 58$).

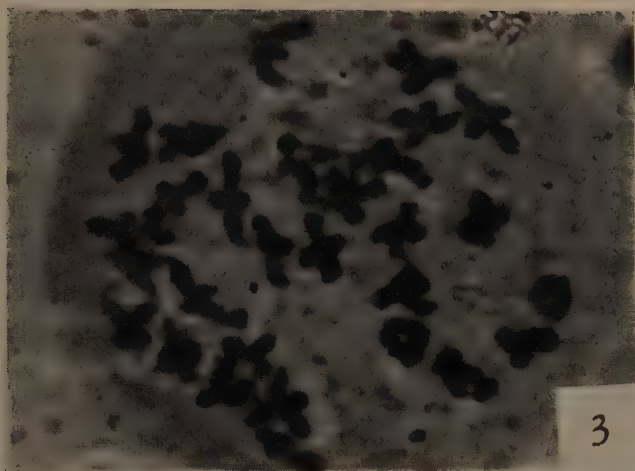
Adiantum è un genere di per sè molto interessante. *Adiantum lunulatum* è polimorfo e la forma più largamente distribuita è un apomittico triploide. Una forma sessuale triploide del complesso vive nell'Himalaya orientale. L'intero complesso è ancora sotto studio da parte di uno degli autori (VERMA).

Il reperto di ROY e SINHA (1957) di una razza diploide per *A. caudatum* è da riferire a una specie affina, ma distinta, *A. incisum*. Pertanto la forma diploide sessuata della specie polimorfa *A. caudatum*, di cui la forma triploide apogama e tetraploide sessuata sono note per Ceylon (MANTON e SLEDGE, 1954) è ancora da scoprire.

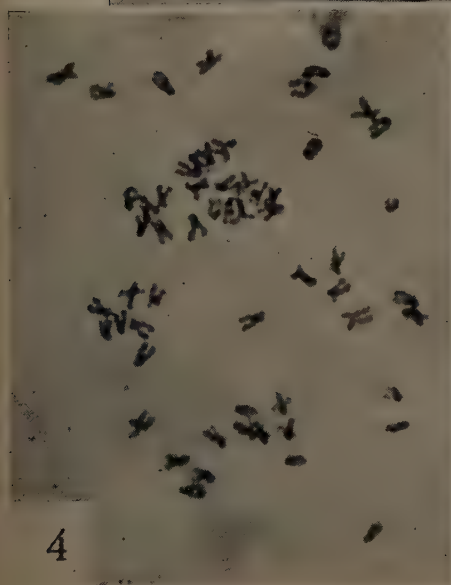
Ogni volta che è stato possibile, la distribuzione geografica delle varie razze cronosomiche delle singole specie è stata ricordata sul testo. Si è concluso che l'attitudine a raggiungere una larga distribuzione è possibile tanto nei diploidi quanto nei poliploidi.



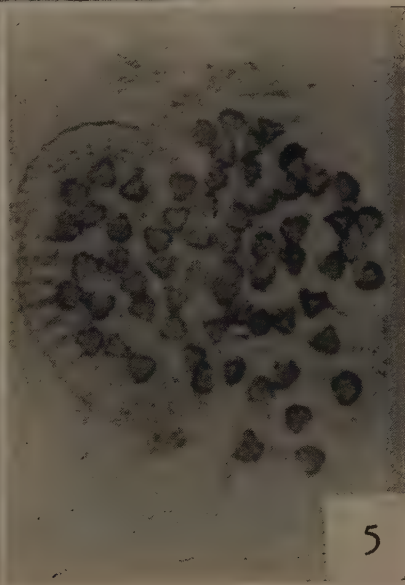




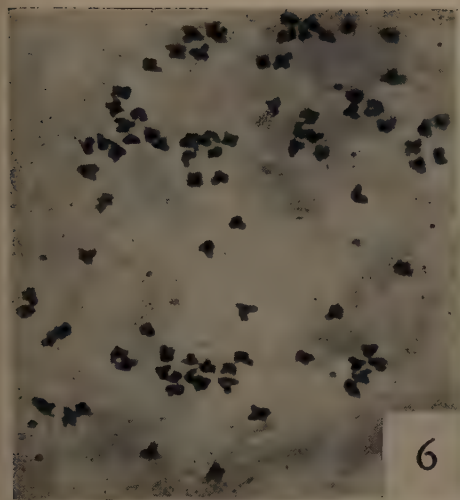
3



4



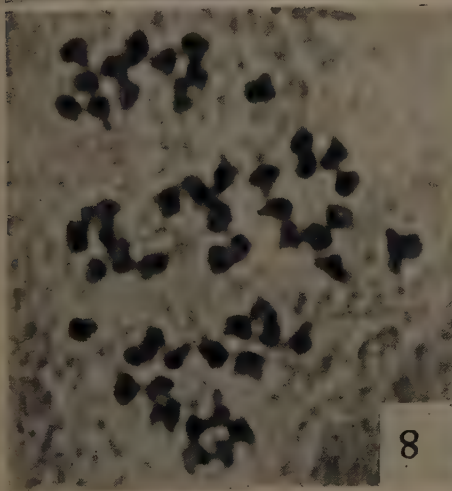
5



6



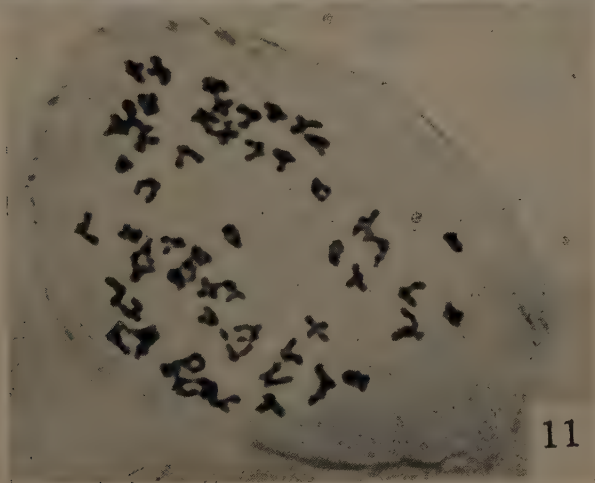
7

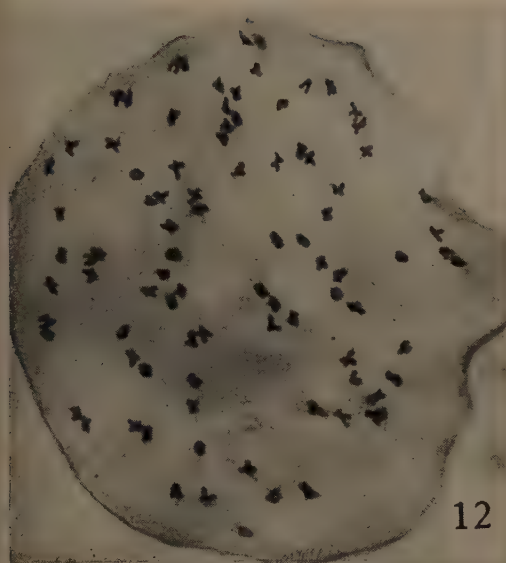


8

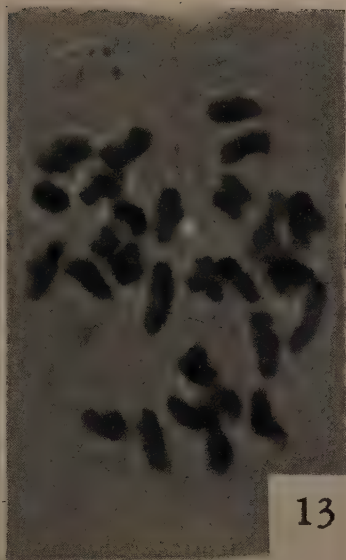


9





12



13



14

ENRICO MESSERI

OSSERVAZIONI GEOGRAFICHE

SULLA ESPRESSIONE FENOTIPICA DEL LOBULO AURICOLARE
IN AFRICA ORIENTALE

(con 3 figure nel testo) *

In Redazione: il 10 Febbraio 1960.

Di recente una missione di studio della nostra Università (Moggi, Savazzano, Funaioli, Simonetta, Bruzzone) si è recata in Somalia per una serie di rilievi naturalistici (botanici, zoologici, antropologici). In una precedente pubblicazione abbiamo reso noto i risultati sull'inchiesta dei gruppi sanguigni dei componenti di alcune tribù somale meridionali. Si tratta ora di illustrare i dati raccolti fra le popolazioni della regione compresa fra i fiumi Uebi e Giuba e Oltregiuba, riguardanti la morfologia del lobulo auricolare. Questa variabilità morfologica risulta sostenuta da fattori ereditari che seguono una particolare modalità di trasmissione e della quale abbiamo già trattato (MESSERI 1959b). Anche sulla frequenza della variabilità fenotipica in Italia abbiamo eseguito le prime osservazioni geografiche in Toscana, in Calabria e in Sicilia (MESSERI 1959a). Per quanto riguarda la dinamica genotipica, la espressione fenotipica e la letteratura sull'argomento rimandiamo ai lavori pubblicati. In questa nota desideriamo occuparci in modo particolare del valore geografico (ecologico) dei reperti ricercati in Africa Orientale, per poter fare un esame comparativo con quelli attualmente noti nel mondo, che pur non essendo numerosi permettono però di inquadrare i nostri dati in una visione panoramica dello smistamento spaziale del fenomeno.

La morfologia del padiglione auricolare è assai complessa e sostenuta verosimilmente da diversi fattori ereditari. Una delle caratteristiche più appariscenti di variabilità fenotipica è data dalla inserzione del lobulo, ed in particolare del suo margine anteriore, rispetto alla cute

* Lavoro eseguito nell'Istituto di Fisiologia Generale dell'Università di Messina. Pubblicato con un contributo del C.N.R.

della regione temporo-mandibolare. Tale inserzione appare completamente aderente alla regione circostante (lobulo attaccato), oppure più o meno indipendente, formando con il resto del padiglione un peduncolo che lo rende molle e pendente (lobulo staccato) (Fig. 1). Dal punto di vista genodinamico abbiamo tenuto conto anche dei valori intermedi tra queste due morfologie, ma dal punto di vista etnologico basta valutare le due modalità opposte (lobulo attaccato e staccato), riportando così un carattere morfologico difficilmente valutabile nella sua intensità ai semplici valori numerici. La frequenza delle due modalità del



Fig. 1 - A sinistra: orecchio con lobulo staccato (peduncolato); a destra: orecchio con lobulo attaccato (sessile).

lobulo costituisce un indice di espressione genetica. È da notare inoltre che le differenze morfologiche auricolari nelle diverse razze sono scarse, contrariamente a quanto accade per altre strutture (naso, capelli, pupille, pebre, colore occhi, ecc.). LEIKER e HILDEN nelle loro ricerche nei Finlandesi e Ungheresi poterono osservare che il lobulo staccato è dominante su quello attaccato. Secondo il QUELPRUD questo carattere sarebbe regolato da una serie di geni polialleli. Nella ricerca attuale abbiamo tenuto conto della frequenza relativa dei portatori del carattere. È da notare anche che il patrimonio ereditario non è il solo a determinare il fenotipo, ma costituisce soltanto una norma di reazione con l'ambiente, determinando l'ampiezza di oscillazione che l'ambiente stesso permette alla variabilità (KÜHN 1942). L'organismo è costituito da un gran numero di norme reagenti con l'habitat che assorbono e orientano le sostanze assunte modellandole plasticamente fino a raggiungere la forma che si osserva nel fenotipo, contraendo dei rapporti reciproci e dinamici fra eredità e ambiente (DOBZHANSKY 1950) secondo una legge ecologica (MESSERI 1952). Le norme di reazione si scindono e si smontano all'atto della meiosi e si ricostruiscono in maniera sempre diversa tanto che i geni che la controllano pongono appaiono come agitati da un « turbine » che secondo CUVIER

tuirebbe l'essenza della razza, purché rimanga costante il patrimonio genico così agitati senza perdite centrifughe nè intrusioni centripete in una specie di isolamento geografico della popolazione (DAHLBERG 1947). Bene in questa considerazione genetica quale valore possiamo attribuire alla fenotipia da noi osservata in Africa Orientale? Certamente esistono delle morfologie che sono legate a delle funzioni sulle quali l'ambiente agisce selezionando con una vis molto severa, tali appaiono per esempio alcune diatesi morbose, oppure la disposizione negativa di resistenza alla intensità luminosa della pelle e degli occhi degli albinici, oppure l'endotelia, che nei tempi remoti, quando l'ostacolo all'allattamento doveva essere insuperabile e insostituibile, costituiva un vero fattore letale per la discendenza (MESSERI 1959). Per il carattere in esame invece non appare evidente nessun attrito diretto con l'ambiente, per tanto un «linkage» con altri caratteri più impegnativi potrebbe aver selezionato nei vari ambienti una frequenza maggiore o minore delle due forme allelomorfe, considerando dominante quella originaria (lobulo penzolante o staccato) e recessiva quella mutante (lobulo attaccato). Anche per i gruppi sanguigni (sistema ABO) non sappiamo quali possono essere le forze selettive dell'ambiente rispetto ai geni P e Q mutanti sul gene R considerato l'originale fattore (universale) della specie umana (BERNSTEIN; comunque la constatazione sperimentale ci mostra che la selezione ha operato attivamente (MESSERI 1960). Dopo questi accenni sul valore da attribuire alle variazioni fenotipiche in esame, coneriamo i dati accertati in alcune tribù somale (307 soggetti):

TABELLA I

	N.	%
Lobulo attaccato	55	17,91
Lobulo staccato	252	82,09
Maschi con lobulo staccato	175	83,6
Femmine con lobulo staccato	77	78,6
Maschi con lobulo attaccato	34	16,4
Femmine con lobulo attaccato	21	21,4

$$M = 209 = 68\%$$

$$F = 98 = 32\%$$

$$\text{Frequenza gene lobulo attaccato} = 0,42.$$

Osservando la Tabella I si nota che la frequenza del carattere recessivo (lobulo attaccato) è del 17,91% su tutto il collettivo: tale frequenza si inserisce nella scala dei valori finora conosciuti per questo carattere (MARTIN 1928, *Lehrbuch der Anthropologie*, pag. 574) al secondo posto subito dopo i Polinesiani (Tabella II).

TABELLA II

Frequenza del lobulo attaccato

	%		%
Polinesiani	15	Russi	35
Bavaresi	20	Negri	36
Filippini	23	Cinesi	38
Ainu	24	Baschi	41,9
Tedeschi	25,5	Lapponi	50
Italiani	26,5	Calmucchi	56
Micronesiani	27,2	Babinga	70
Papua	29		

Scorrendo la Tabella II, si nota che in generale l'ampiezza della variabilità raziale nella sua espressione fenotipica (Fig. 2) oscilla da un minimo del 15% nei Polinesiani e un massimo del 70% nei Babin. Questa variabilità è vastissima e comprende una apertura del 55% (vedi istogrammi). Come spiegare questo fenomeno sul piano biologico? Forse certamente una differente frequenza etnogeografica del fattore recessivo (lobulo attaccato), ma può darsi che accanto a questa esista anche una recessività incompleta per cui partendo da una penetrazione nuova in patrimoni ereditari diversi si possono verificare penetranze diverse (MESSERI 1959a) e ciò potrebbe imputarsi sia all'isolamento geografico, alle frequenze mutazionali, sia alla selezione ambientale, sia ai «drift». In tutte queste eventualità lo smistamento frequenziale fenotipico osservato potrebbe essere il risultato di una serie di azioni e reazioni genetiche e ambientali delle quali non vediamo che un pallido riflesso nella fenologia. Del resto è facile comprendere come possono esistere delle differenze fra popolazioni lontane fra loro sia razialmente che geograficamente e

per es. fra Polinesiani (15%) e Lapponi (50%), mentre è difficile considerare dal punto di vista ecologico variazioni esistenti fra popolazioni etniche ed etnicamente omogenee come è risultato da una recente ricerca eseguita in Calabria e in Sicilia, sulle opposte sponde dello stretto di Messina (21,58% e 18,50%) e ancor più dallo studio di due campioni di popolazioni toscane a Livorno e a Firenze (17,13% e 25%), probabilmente

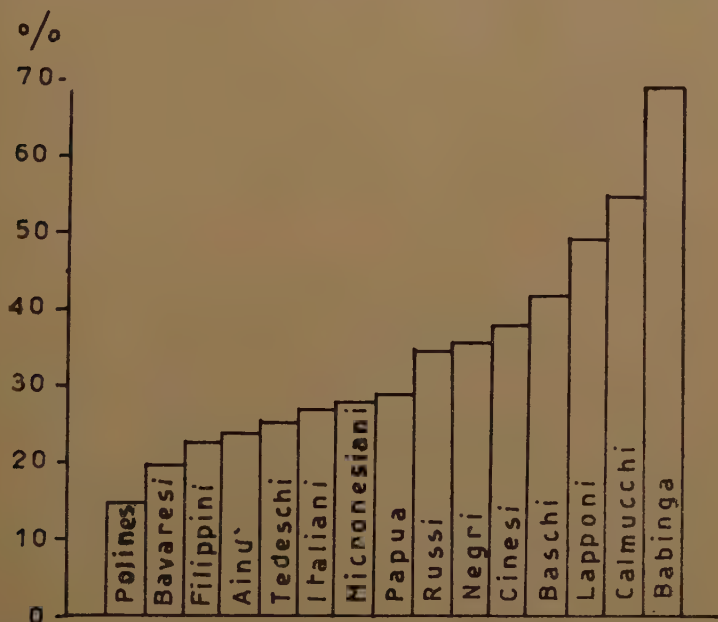


Fig. 2 — Frequenza del *lobulo attaccato* presso i vari popoli finora studiati.

trambi eredi dell'antica stirpe etrusca. Costatazioni ancor più evidenti su questo fenomeno sono apparse a proposito dello smistamento del carattere inerente alla sensibilità verso il test PTC in Italia (Piemonte PTC = 58%, Lombardia = 25%) (MESSERI 1959c). Pur tuttavia la frequenza della modalità recessiva nei Somali rappresenta una stigmata specifica che differenzia queste popolazioni da quelle finitime, di cui possediamo i dati, come per es. i Negri (36%), e le avvicina invece a popolazioni lontane geograficamente ed etnicamente come i Polinesiani (15%) i Bavaresi (20%) e ancor più i Siciliani (18,50%), coincidendo quasi del tutto con i Toscani di Livorno (17,13%) (Fig. 3).

Se si considera le differenze frequenziali del fenomeno nei due sessi possiamo osservare che nel nostro collettivo (vedi Tabella I) la frequenza del lobulo attaccato è minore nel maschio del 5% rispetto alla femmina, ciò che trova riscontro nello studio analogo fatto in Calabria. La maggior frequenza del lobulo attaccato nella donna è stata osservata anche da RIDDER e QUELPRUD (GATES 1948, p. 245), la particolarità riscontrata nel collettivo somalo conferma dunque una caratteristica biologica della nostra specie.



Fig. 3 — Frequenza del lobulo attaccato, in ordine crescente, presso alcuni popoli saggiati.

La relativa costanza del comportamento di questo carattere nei pochi gruppi finora indagati, con la differenza sessuale messa in evidenza, dovrebbe essere ulteriormente approfondita in quanto potrebbe realizzarsi altrove in maniera diversa da quella per ora osservata. È da ricordare infatti che la permanenza a distanza nel tempo dei «drift» operata da antichi trapianti etnici ancora attivi per un relativo isolamento geografico, e le possibilità di determinate frequenze mutazionali, rappresentano delle eventualità che possono aver giocato decisamente in questo fenomeno, coadiuvate sempre dalla selezione naturale, o forse indirettamente su un gene più sensibile all'ambiente, linkage con quello in esame, in modo che la variabilità fenotipica osservata nell'orecchio possa sempre riposare su forze ecologiche di smisurato spazio.

Sarebbe stato oltremodo interessante, come è stato fatto per i gruppi sanguigni (MESSERI 1960) poter osservare le frequenze fenotipiche

quelle geniche anche nei popoli vicini, che la tradizione storica e i tratti somatici ci fanno supporre esser stati un tempo a reciproco contatto, ma questo confronto è impossibile per ora per la mancanza dei dati statistici relativi.

Concludendo, si può notare che il carattere ereditario: lobulo attaccato o staccato fra le tribù somale meridionali mentre non può essere per ora inquadrato etnicamente, per mancanza di ricerche analoghe nei popoli vicini, porta però un contributo notevole da un punto di vista antropologico, e soprattutto da quello ecologico, permettendo di constatare norme di reazione assai differenti dei geni responsabili in popolazioni vicine sia etnicamente che geograficamente, mentre talora sono visibili norme molto simili, se non addirittura quasi identiche, in popolazioni molto lontane fra loro sia per lo spazio che per la razza.

BIBLIOGRAFIA

- BIASUTTI R., 1959. — *Razze e Popoli della Terra*. Utet, Torino.
- BOYD W. C., 1950. — *Genetics and the races of man*. Little, Boston.
- COON C., 1950. — *Races*. Thomas, Springfield.
- DAHLBERG G., 1947. — *Mathematical Methods for population genetics*. Konge.
- DOBZHANSKY T., 1950. — *Human diversity and adaptation*. Cold Spring. 15, New York.
- FORD E., 1948. — *Genetica*. Longanesi, Milano.
- HATES R. R., 1948. — *Human Genetics*. MacMillan, New York.
- KÜHN A., 1942. — *La teoria della ereditarietà*. Einaudi, Torino.
- MARTIN R., 1928. — *Lehrbuch der Anthropologie*. Fischer, Jena.
- MESSERI E., 1955. — *Ecologia umana*. Archiv. Antropol. Etnol., **85**: 17-81.
- , 1958. — *L'areola mammaria nell'infanzia*. Caryologia, **12**: 132-145.
- , 1959a. — *Sulla morfologia del lobulo auricolare in Italia*. Caryologia, **12**: 179-185.
- , 1959b. — *Morfologia auricolare in Calabria*. Caryologia, **11**: 368-381.
- , 1959c. — *Inchiesta genetica col test PTC in Italia*. Caryologia, **12**: 265-298.
- , 1960. — *Considerazioni geografiche sulle frequenze dei gruppi sanguigni ABO in alcune tribù somale*. Caryologia, **13**: 469-485.
- MONTAGÚ M. F. A., 1951. — *An introduction to the physical Anthropology*. Thomas, Springfield.
- MONTALENTI G., 1959. — *Genetica*. Treves, Napoli.
- PARIENTI R., 1955. — *Biologia delle razze umane*. Libreria Gollardica, Pisa.
- SCHNEINFELD A., 1952. — *L'ereditarietà*. Longanesi, Milano.
- STERN C., 1950. — *Principles of human genetics*. Freeman, S. Francisco.

SUMMARY

The author has studied the phenotypical variability of ear lobule in some tribes of South Somaliland, and has compared these data with the other ones already known in the world.

RIASSUNTO

L'A. ha indagato sulla variabilità fenotipica del lobulo auricolare in alcune tribù somale meridionali, confrontando il fenomeno con i dati conosciuti nel mondo.

QUESTIONI DI RADIOBIOLOGIA GENERALE

6. LA «ZONA D'AZIONE»,

(con 15 figure nel testo)

In Redazione: il 10 ottobre 1959.

INTRODUZIONE E PREMESSE

Un particolare modo di raffigurarci l'azione dei raggi X nei corpi irradiati fu da me prospettato nel 1929 (CASATI 1929a), quando formulai l'ipotesi della «zona d'azione», deducendola da alcuni miei rilievi sperimentali di ordine chimico-macroscopico (1928) ed istologico (1929b): ma nell'enunciarla, con un'extrapolazione quanto mai ardita per me che osavo proporla, la trasportavo nel campo atomico e molecolare.

Base teorica fondamentale il concetto che le radiazioni e le particelle ionizzanti, primarie e secondarie, *si diffondono* dentro un corpo irradiato — considerato *un tutto unico* rispetto all'energia radiante —, per cui i singoli elementi costitutivi — specie se molecole e cellule — ne sono contemporaneamente investiti e colpiti *da tutte e in tutte le direzioni*, anzi sono *sede di fenomeni secondari energetici*.

Nella stesura del lavoro si fa esplicito accenno al «bombardamento dei corpi sottoposti ai raggi X», in cui ben si sottintende l'«apporto discontinuo di energia» contro un «bersaglio» colpito in un «urto».

L'azione dei raggi X si riscontra in «zone discontinue» del corpo irradiato.

Per spiegare il rilievo mi riferivo espressamente al fatto che l'energia radiante — oltre che diffondersi — «si degrada» e si trasforma nel corpo colpito in vari fenomeni secondari, per i quali in ultima analisi avvengono le modificazioni negli elementi costitutivi «a zone» e per vari meccanismi d'ordine fisico-chimico, biofisico e radiobiologico, che si rinforzano e si annullano in senso molto lato, creando così degli optimum energetici appunto in «zone discontinue»: onde la denominazione di «zone d'azione», che si intendono esclusivamente come «zone di effetti», dai limiti e dalle estensioni le più diverse.

* Docente di Radiologia Medica, Firenze.

È bene subito ricordare che in quel tempo la «teoria dell'urto» mi era stata ancora formulata, essendo comparsa vari anni più tardi, e mando senz'altro al libro di BUZZATI-TRAVERSO e CAVALLI (1946).

Successivamente, nella seconda nota di questa serie (CASATI 1957) facevo appunto un raffronto fra i concetti informatori della «zona d'azione» e quelli della «zona d'urto» — sia gli originali (diciamo) «primari» — quelli proposti in un secondo tempo, non ben inquadrabili nella teoria primitiva —, dimostrando con un'analisi critica come gli uni e gli altri specie i secondi, potessero inserirsi senza alcuna difficoltà nel modo di intendere la «zona d'azione», che veniva così ad acquistare un significato più ampio, trovandovi una conferma a quanto da tempo avevo sostenuto.

Potevo perciò dare questa definizione:

La ZONA D'AZIONE si ammette di volume dalle estensioni più diverse, anche se non specificate e calcolate, ma con netto concetto spaziale come forma e dimensioni, che ben si addice anche ad intendere la «zona d'urto» contemporaneamente investita e colpita da tutte e in tutte le direzioni dalle varie energie in gioco, sede anzi di fenomeni secondari spazialmente considerati, per il bombardamento dei raggi X e perciò con implicite nozioni concetti del «proietto», del «bersaglio» e dell'«urto»; dai confini non netti: «discontinua» nel corpo irradiato: una vera e propria realtà fisica, molto più vicina al concetto di volume vero (V) che non al volume di urto formale (v): intesa come «zona di effetti» dovuta alle resistenze di tutte le varie energie in gioco — fotoniche, elettroniche, primarie e secondarie — che nella «zona» contemporaneamente agiscono per meccanismi che si rinforzano e si annullano, di vario ordine e natura e in un certo senso specifiche, cioè ai vari effetti corrispondono quegli optimum energetici, che si possono definire caratteristici e che «discontinuamente» si verificano nel corpo irradiato.

Mi sembra interessante ricercare ancora nella letteratura degli ultimi anni, ulteriori conferme dal punto di vista fisico, chimico ed istologico a questa mia ipotesi, per inquadrare altri fatti ed altre idee particolari nel mio postulato di ordine generale.

I. LA «ZONA D'AZIONE» DAL PUNTO DI VISTA FISICO (1).

Prima di tutto osservo che nei moderni trattati di Radiobiologia — come «Radiation Biology» dell'HOLLAENDER (1954) e «Actions chimique

(1) Comunicato al 43° Raduno dei Radiologi Tosco-Umbri; Lucca, giugno 1956.

et biologiques des radiations» dell'HATSSINSKY (1955) — la «*distribuzione*» e l'«*eventuale localizzazione nello spazio*» dell'energia dissipata nei corpi irradiati trovano il loro dovuto svolgimento, come questioni importanti e fondamentali.

Naturalmente tale studio presuppone la conoscenza dei fenomeni di ordine microfisico e rimando ai trattati sopraricordati.

Ora per far intendere la «*zona d'azione*» ho sempre sostenuto come concetto-base, che è importante raffigurarci mentalmente gli *eventi microfisici e quali e quanti di questi siano raggruppati o contemporaneamente agenti*. Nell'HOLLAENDER (1954) a pag. 194 FRANCK e PLATZMANN esprimono un concetto simile.

Quanto mai interessante sotto vari aspetti è apparso, specie negli ultimi tempi, lo *studio delle traiettorie* delle particelle di grande energia (il percorso di una particella si chiama «*range*» ed è espresso in μ). Così l'energia si trasferisce dal punto di impatto in una zona più lontana: lungo la traiettoria la particella cede energia, dando luogo a fenomeni secondari e la sua traiettoria acquista un valore del tutto particolare, se intesa come la «*sede*», in cui avvengono i vari fenomeni oppure se considerata in funzione della velocità media nella perdita istantanea di energia per unità di lunghezza (TEL o LET, — linear transfert energy).

Nell'HOLLAENDER (1954), a pag. 314, lo ZIRKLE così si esprime: «...gli ioni e le molecole eccitate non si formano *singolarmente e a caso* ma sono localizzate *lungo le traiettorie* delle particelle...» e FANO (1954, pag. 77) precisa: «...le ionizzazioni e le eccitazioni avvengono *lungo e all'intorno delle traiettorie*». Perciò si comprende agevolmente come le *traiettorie* siano anche considerate «*linee ideali che occupano il tratto medio della regione, dove sono distribuiti gli eventi*» (FANO 1954, pag. 78). E si specifica che le ionizzazioni sono localizzate *lungo* le traiettorie delle particelle ionizzanti, mentre le eccitazioni sarebbero localizzate in un campo o in una zona più larga *all'intorno* delle traiettorie, secondo il classico modello di LEA (1946, 1947).

Il che ha trovato una conferma sperimentale nelle microfotografie di HERMANN SCHAEFER (fig. 1) per lo studio delle traiettorie in un'emulsione fotografica prodotte da nuclei pesanti ($Z = 20$) di varia energia — di 4000 Mev. (a destra), di 400 Mev. (al centro) e da particelle alfa del torio (a sinistra). Infatti intorno alla traiettoria principale di ognuna di queste si notano varie ionizzazioni laterali, più o meno numerose, in uno spazio più o meno esteso in rapporto diretto con l'energia delle particelle primarie, sempre più rare con l'allontanarsi dalla traiettoria: riesce possibile determinarne la localizzazione e la misura in μ . Tanto che l'A. ha costruito il diagramma della dispersione radiale delle ionizzazioni intorno alle traiettorie, calcolate percentual-

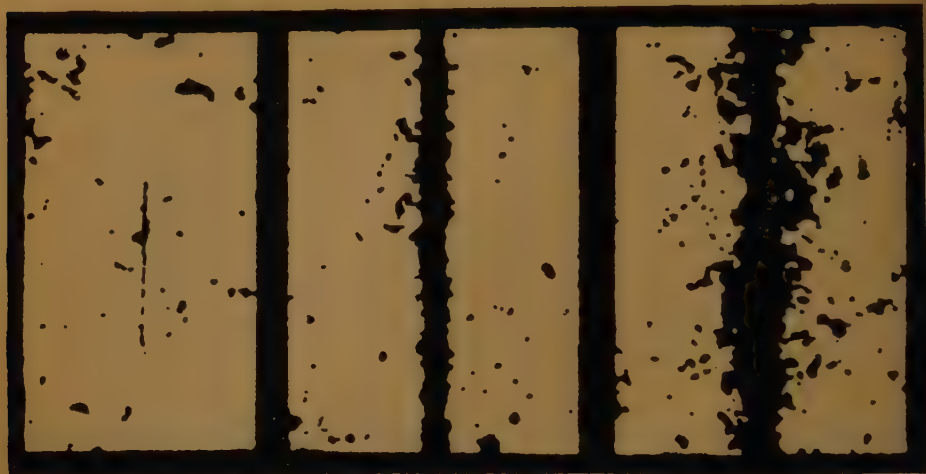


Fig. 1. — Traiettorie in un'emulsione fotografica prodotte da nuclei a cariche multiple (da HERMANN SHAEFER, U.S. Naval Air Research Report 11634), Lunghezza totale del campo visivo = 58 μ (per spiegazione v. testo).

mente in densità ionica e le ha raffrontate in scala e misura proporzionali ad un nucleo di una cellula in cariocinesi, dimostrando così come le ionizzazioni possono colpire variamente i singoli cromosomi in senso localistico e quantitativo (fig. 2).

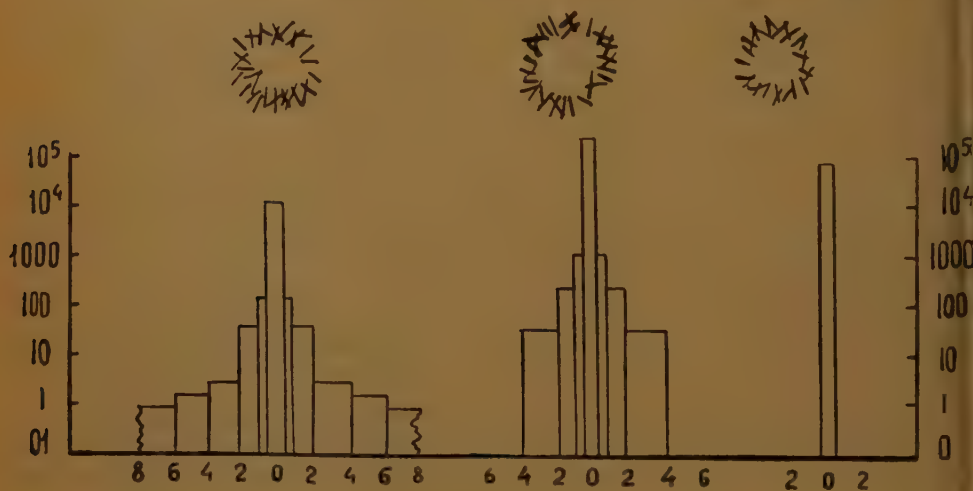


Fig. 2. — Dispersione radiale delle ionizzazioni intorno alle traiettorie di nuclei pesanti e di particelle alfa. La parte superiore della figura rappresenta un nucleo in metafase.

Ma non si debbono dimenticare i *fenomeni secondari*, che a tali ionizzazioni si accompagnano, sulla cui importanza ai fini degli effetti da raggi X ho più volte insistito. E ricordo specie gli elettroni primari e secondari, che per « inelastic collisions » (urti anelastici) o per passaggio più o meno vicino ad un elettrone atomico, dentro il cosiddetto « radium of action » (raggio d'azione), danno luogo alle successive ionizzazioni e agli altri fenomeni di accompagnamento con le ben note modalità fisiche, spaziali ed energetiche, secondo la sostanza irradiata e l'energia della radiazione incidente. A cui ben si attaglia l'affermazione dello ZIRKLE: « ...il volume totale formato dalle varie traiettorie è una piccola frazione del volume totale di una cellula... » e di una molecola, come io aggiungo. Quindi logico ammettere che in questo « volume totale » vengano comprese anche le traiettorie degli elettroni secondari, il che completa le affermazioni degli AA. ricordati e ci si rende ragione « come dentro un dato atomo da un solo evento ionizzante possono prendere origine vari ioni » (FRANCK e PLATZMANN, in HOLLAENDER 1954, pag. 196) e come « le radiazioni ionizzanti possono ripetere il loro identico meccanismo d'azione qua e là in vari atomi » (FANO 1954). Il che vuol dire, secondo i concetti della « zona d'azione » che i *microeventi sono multipli, variamente localizzati (o raggruppati) ed anche contemporanei*.

Mi pare che non ci siano difficoltà ad accostare sia la « *traiettoria* » come sopra considerata, sia questo « *volume totale formato dalle varie traiettorie* » alla « *zona d'azione* »: tanto più che qui si sottintende e l'una e l'altra come *zona di effetti* in rapporto alla *distribuzione spaziale degli eventi fisici*, che sulla traiettoria è considerata di solito come numero di paia di ioni formati per ogni unità di lunghezza — cioè in termini di « densità ionica lineare ». Ma qui può bene intendersi anche come *numero totale di ioni*, che si formano in detti volumi direttamente dipendenti dall'energia e dal numero delle particelle e dei fotoni incidenti — cioè anche dipendenti dall'intensità —, rimandando a quanto ho sostenuto in un precedente lavoro (CASATI 1931), che FRANCK e PLATZMANN (1954) riconfermano a pag. 243 e seg.

Del resto la *massa* e il *volume* rientra come termine di riferimento nelle definizioni e nelle formule dosimetriche — il r si riporta a 0,0001293 g. d'aria, il rad, unità di dose assorbita, è una densità di energia dissipata uguale a 100 r per grammo di mezzo assorbente.

Il GRAY poi nell'HAISSINSKY (1955) trattando l'assorbimento dei raggi X, dà per l'assorbimento fotoelettrico (τ) una formula, dove si considera un N, ossia il « numero dei fotoni per centimetro quadrato », incidenti con un'energia data su un sottile spessore δx di sostanza assorbente e si rapporta allo Z dei vari elementi irradiati e al percorso in

μ dei singoli fotoelettroni: per l'assorbimento Compton (σ) con raggi duri ricompare l'« *spessore δx del mezzo assorbente* » grande da contenere per intero tutte le traiettorie degli elettroni di rinculo, perchè solo in questo caso viene utilizzata in toto l'energia apportata dai fotoni e convertita in energia cinetica degli elettroni. Si dice allora che l'energia media dei fotoni e l'energia media degli elettroni di rinculo si trovano *in condizioni di equilibrio*, che per gli effetti osservabili sono considerate l'*optimum*.

In pratica tale equilibrio si raggiunge con *uno spessore di qualche mm. di sostanza irradiata*.

Il che trasportato nell'ipotesi della « *zona d'azione* » in rapporto a *fenomeni di ordine macroscopico*, vuol dire che per produrre degli effetti occorre un *minimum di volume* e che solo in un *minimum di volume* possono essere osservati degli effetti; cioè in una « *zona d'azione* ».

Avere attribuito alla « *zona d'azione* » un *volume* è stata ed è anche oggi una logica necessità concettuale, al quale ben si attagliano eventuali variazioni *quantitative e qualitative*, in rapporto alla grandezza delle singole « *zone d'azione* » e alle varie energie in gioco, foto — Comptonelettroni, raggi δ , radiazioni primarie e secondarie, ionizzazioni ed eccitazioni, produzione di coppie.

La « zona d'azione » è inomogenea per definizione e natura.

Una controprova pratica e sperimentale, sempre nel campo della determinazione delle dosi, in questo ordine di idee, vanno considerate le cosiddette *zone di transizione*, ben rilevate dalle piccole camere dosimetriche, volumetricamente non adatte, perchè la radiazione secondaria elettronica non è in equilibrio con la radiazione primaria fotonica e la dose assorbita e gli effetti ionizzanti sono relativamente minori rispetto all'energia ceduta dai fotoni.

Quindi oggi in campo di ricerche dosimetriche è stato dimostrato sperimentalmente che esistono dei *volumi* (di aria nel caso presente), dove l'energia assorbita è *quantitativamente diversa*.

In campo radiobiologico sperimentale lo studio della distribuzione della dose nei tessuti molli tutto intorno e dentro ad un osso irradiato, con una data dose di raggi X ad un vario voltaggio (fig. 3), ha portato il GRAY ad ammettere perfino una « *specificità d'azione qualitativa* ».

Ora se poi consideriamo la non omogeneità — atomica e molecolare — di una sostanza irradiata (e tanto più di un organismo vivente), questa possibilità di *variazioni qualitative e quantitative aumenta grandemente*, come è oggi generalmente ammesso: il che corrisponderebbe secondo la mia ipotesi a *varie, diverse, molteplici « zone d'azione », contemporanee nella sostanza stessa*.

Queste importanti osservazioni mi sembrano giustificare il tentativo di rappresentare, sia pure in modo schematico ed approssimativo, la «zona d'azione», come qui intesa.

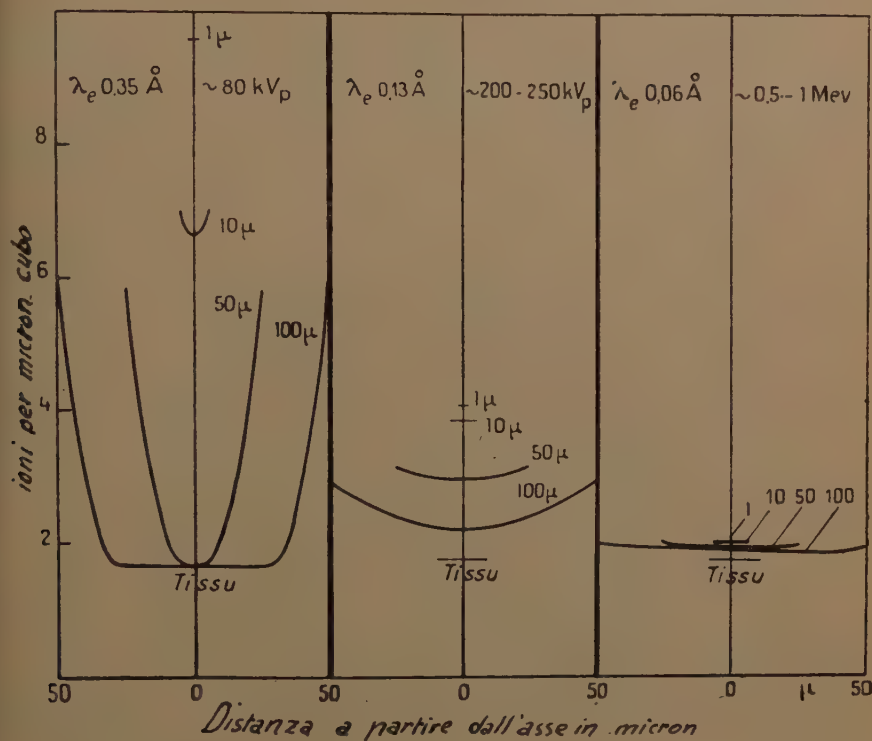


Fig. 3. — Distribuzione della dose in rads nei tessuti molli intorno ad un osso esposto a 1 r di raggi X da 80 kV., 200 kV., 500 kV. e più (da SPIERS 1951).

In «Radiation Biology» trovo a pag. 71, in una figura che qui riproduco (fig. 4 a), lo schema di una traiettoria a zig-zag di un fotone con i vari effetti Compton con i relativi elettroni di rinculo laterali (1, 2, 3, 4) ed i relativi punti di azione diretta (·) ed infine con il fotoelettrone terminale (5). Se si intrecciano, l'una sull'altra, varie di queste traiettorie si ottiene quello che è schematizzato nella fig. 4 b che secondo me risponde al sopradetto scopo, quando naturalmente si tengano presenti anche le singole interazioni dei fotoni e degli elettroni, dei quali sono ben note e calcolate le distribuzioni statistiche sia

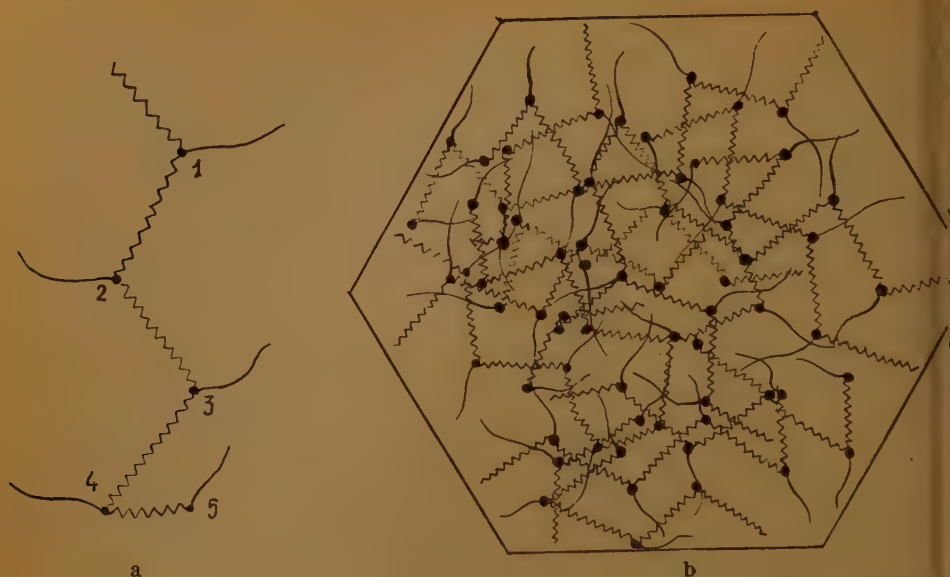


Fig. 4. — A sinistra, schema di traiettoria di un elettrone; a destra, schema di « zona d'azione ».

di probabilità che percentuali (v. ibidem lo schema a pag. 38) e la loro diversa energia.

Le traiettorie qui riportate sopra un piano sono in effetti disposte nello « spazio in varie direzioni », soprattutto tenendo in conto le distribuzioni angolari dei fotoni e dei Comptonelettroni e vanno intese come molto ravvicinate, data la densità della materia, e certamente come relativamente molto più brevi. Nulla ci vieta di inscrivere il complesso di queste traiettorie in una data figura geometrica, di due o meglio di tre dimensioni cioè nel senso « spaziale », che viene così a delimitare « graficamente » una « zona d'azione », la quale può essere contenuta in una molecola o in una cellula oppure contenere un gruppo di molecole o di cellule.

Ma tutto questo non è solo completamente schematico e figurativo, perchè nel « Certain Aspects of the Action of Radiation on living Cell » a pag. 10 (1957), ritrovo una figura quasi simile del GRAY (fig. 5), che riporta una fotografia di ionizzazioni da raggi ottenuta in una camera di Wilson in cui le traiettorie si avvicinano, si allontanano, si sovrappongono, si intrecciano, si intersecano in tutti i sensi: e proprio questa caratter-

la di intreccio di traiettorie e di ionizzazioni da raggi X è la differenza fondamentale es. dal tratto rettilineo di ionizzazioni dovute ad una particella alfa.

Valgono ancora le stesse considerazioni fatte più sopra sia nel senso della « disposizione spaziale » delle traiettorie — qui sempre riportate in un piano — sia nel senso diarle circoscrivere tutte o parte in una grande e totale o in più piccole e parziali figure metriche (« grande zona d'azione » nel primo caso, « piccole zone d'azione » nel secondo).

Resulta chiaro come una « grande » « zona d'azione » possa essere la *resultante geometrica* di più « piccole » « zone d'azione ».

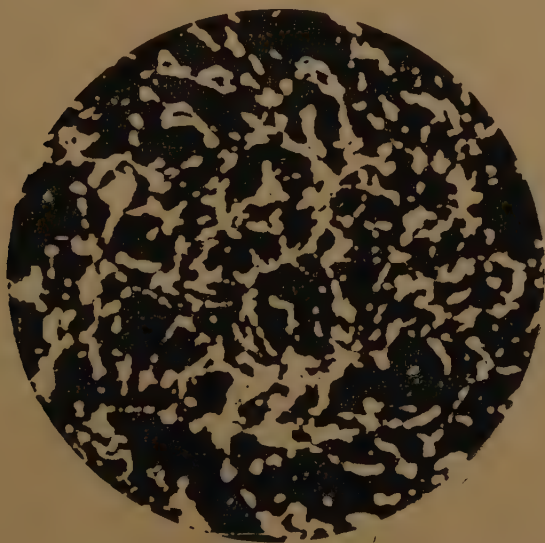


Fig. 5. — Ionizzazione da raggi X in camera di Wilson (da GRAY 1947).

Nei miei lavori non ho mai accennato a dei limiti anche approssimativi della « zona d'azione » ed ho anzi insistito nell'intenderla « dai limiti e dalle estensioni le più diverse ». Ma oggi nella letteratura si trovano alcuni dati, che credo interessante riportare, perché si precisano i dati e misure, che potrebbero servire a delle « localizzazioni spaziali » allungando agli eventuali volumi.

Riporto dal BURTON (1958) questo schema, in cui sono considerati i « range » o percorsi in μ ed il LET delle singole particelle ionizzanti aventi varia velocità in rapporto alla loro energia e la corrispondente distanza fra gli effetti primari (ionizzazioni) lungo la loro traiettoria in A.

Particella		Percorso in μ	LET	Distanza in μ
Elettrone	100 ev.			5,9
»	50 Kev.	43	0,67	130
»	100 Kev.	141	0,417	2150
»	450 Kev.	1500	0,21	4600
	1 Mev.			varie migliaia
Protone	1 Mev.	23	27,7	25
»	10 Mev.	1211	4,7	19
Alfa	1 Mev.	5,3	264	1,9
»	10 Mev.	108	56	14

Anche DE WURST, SAMUEL e MAGEE (1954) danno valori presso a poco uguali. Su ogni ionizzazione primaria si presume prenda origine un elettrone di 75 ev., tutti gli elettroni secondari come δ sono diffusi a caso, percorrenti non più di qualche Å — in pratica qualche diametro molecolare —, producendo nuovi ioni e molecole eccitate. SAMUEL e MAGEE (1953) chiamano « spur » lo spazio entro cui si diffonde l'energia del processo primario raggruppandovi le ionizzazioni primarie, i percorsi degli elettroni secondari con le ionizzazioni e le eccitazioni secondarie, che ne seguono.

Il che viene a *confermare il concetto* espresso nella definizione della « zona d'azione » quando fra le « energie in gioco » preciso doversi comprendere anche i « fenomeni secondari spazialmente considerati ». « Spur » si traduce come « dispersione della traiettoria primaria » in rapporto specialmente alla formazione di prodotti chimici intermedi reattivi (radicali soprattutto) (MAGEE 1955), intesi fra l'altro in senso reattivo e dinamico. Ma mi sembra che il *concetto fisico « spaziale »* sia implicito e fondamentale: infatti la teoria ammette che con ionizzazioni primarie isolate e a grandi distanze questi « spurs » appaiono e restano fenomeni isolati, ma con ionizzazioni primarie ravvicinate o raggruppate gli « spurs » si sovrappongono in parte o in toto: quindi *piccole ed isolate « zone d'azione »* nel primo caso, *grandi « zone d'azione » per confluenza* nel secondo.

BURTON chiama « grappes » (sulla falsariga degli « ion-clusters » di LEA) le regioni dove le ionizzazioni si concentrano (2, 3, 4), calcolate dell'ordine di 5 Å con elettroni di 75 ev., dell'ordine di 125 Å con elettroni di 50 kv. con « grappes » fino a 16 ionizzazioni (in media 4).

Da quanto sopra si può predisporre per un calcolo in casi particolari, rapportando le molecole ed ancor meglio in radiobiologia a cellule o ad organuli di cellule.

Perciò queste constatazioni mi permettono di prospettare in campo fisico l'ipotesi che *più eventi microfisici raggruppati e contemporaneamente agenti diano luogo ad una «zona d'azione» nell'ambito ultramicroscopico, più «zone d'azione» di questo ordine raggruppate diano luogo ad una «zona d'azione» rilevabile con i nostri mezzi d'indagine.*

Una scala di valori e di proporzioni, che prende origine e s'inquadra quanto è stato detto e discusso in campo fisico negli ultimi anni.

Riassumendo, dal punto di vista fisico si riconosce innanzitutto la necessità di «*localizzare*» comunque gli effetti dell'energia radiante in un «*volume*», su scala atomica e macroscopica (GRAY).

Si cerca non solo di specificare nel miglior modo possibile gli eventi primari e secondari — per ora eccitazioni ed ionizzazioni e di queste si propone anche una classificazione (GRAY) — ma anche di *precisarne la sede e soprattutto le eventuali traiettorie.*

Si considera che *solo lungo e all'intorno della traiettoria si localizzano gli eventi*, ai quali si debbono i fenomeni osservati: perciò *quel volume totale di tutte le traiettorie* (ZIRKLE), inteso come «zona dove si cumulano gli effetti», corrisponde ad una vera e propria «zona d'azione» nel senso da me sostenuto. Lo stesso concetto dello «spur» (SAMUEL MAGBEE) o della «grappe» (BURTON) rientra nei termini e nella definizione della «zona d'azione».

Si conclude che una «zona d'azione» non può corrispondere che ad un «*volume tridimensionale*».

LA «ZONA D'AZIONE» DAL PUNTO DI VISTA ENERGETICO (2).

Nella definizione sopraricordata la «zona d'azione» viene intesa come «contemporaneamente investita e colpita da tutte e in tutte le direzioni *dalle varie energie in gioco...* che agiscono per meccanismi che si rinforzano e si annullano». Perciò si vuole metterla a raffronto con il concetto del TEL o LET (linear energy transfer — trasferimento lineare di energia) (ZIRKLE).

Va ricordato che nella teoria «dell'urto» già si parla di «trasporto di energia», per l'energia dal punto di impatto o di assorbimento si trasferisce in un punto lontano (1)

(2) Comunicato al 44° Raduno dei Radiologi Tosco-Umbri. Siena, Dicembre 1956.

cosidetto « punto sensibile »), dopo un certo cammino, più specialmente attraverso un numero di atomi: lungo questa traiettoria avvengono delle « ionizzazioni », fenomeni silari e fondamentali secondo detta teoria, la quale ha fissato anche il concetto di « densità ionica lineare » cioè il numero di paia di ioni, che si formano lungo ogni unità di lunghezza di traiettoria. Questa densità varia dentro limiti estesi secondo le singole particelle ionizzanti, minima per un elettrone rapido, è massima per una particella alfa.

Ma, in seguito, alla pura e semplice « densità ionica » si è accostata concettualmente anche l'energia, che in tali fenomeni entra in gioco e così a numerose ionizzazioni per un certo tempo si fa corrispondere una grande energia, a poche ionizzazioni una scarsa energia data od assorbita.

E il primo passo che ha condotto al TEL.

TEL vuol dire appunto *perdita di energia lungo la traiettoria* ha assunto negli ultimi tempi un valore tutto suo particolare, in quanto gli effetti prodotti ed osservati sono fatti risalire all'energia ceduta secondo questo parametro sono considerati.

Perciò va subito rimarcata questa identità di vedute e di concetti circa il ruolo dell'energia nella « zona d'azione » e nel TEL.

Di più anche nel TEL viene considerata l'energia totale dissipata in tutte le traiettorie delle varie particelle ionizzanti, perchè rappresenta una media aritmetica cioè

$$\text{TEL} = \frac{\text{energia totale di tutte le traiettorie}}{\text{lunghezza totale}}$$

e viene rapportata ad ogni unità di lunghezza di traiettoria, espressa in migliaia di ioni volta per micron, cioè in K ev/ μ .

Questa energia totale di tutte le traiettorie corrisponde all'energia dissipata in quel *volume totale formato dalle varie traiettorie*, proposto dallo stesso ZIRKLE, che ho preso in considerazione nel capitolo precedente, per mostrarne la sua identità con la « zona d'azione », tanto che detto « volume totale » sostenevo doversi intendere come *zona di effetti* in rapporto alla *distribuzione spaziale degli eventi fisici*: caratteristica questa molto importante nella definizione della « zona d'azione ».

Da una tabella, quanto mai istruttiva che riporto dal GRAY (1954) ecco i valori del TEL relativi ai raggi gamma, beta, alfa, X, cosmici ed ai neutroni (a pag. 55 dell'Halsky 1955, Vol I).

	Sorgente di radiazioni	Densità media lineare di ioni	TEL in Kev. / μ	Particella ionizzante
raggi β e γ di grande energia	Betatrone di 20 e 30 Mev., radioelementi	8,5	0,28	elettrone
raggi gamma	Radium	11	0,36	
raggi X	1000 Kv.	15	0,49	
»	200 Kv.	80	2,6	
»	8 Kv.	145	4,7	protone
neutroni	Ciclotrone da 12 Mev.	290	9,5	
raggi X	3 Kv.	300	9,8	
neutroni	Ciclotrone da 8 Mev.	380	12,4	
raggi X	1,5 Kv.	460	15	particelle alfa
neutroni	900 Kv.	840	35,8	
raggi alfa	del radon	3700	120	
»	del polonio	4500	146	
raggi atomici	Fissione dell'uranio	130000	4240	particelle nucleari

Questi valori del TEL rappresentano una media, che si ottiene dividendo l'energia data da una particella per il suo percorso, in base alle ricerche sperimentali messe a punto per queste misure. Ma è ben noto che una particella ionizzante durante la sua traiettoria perde la sua energia con un tasso sempre più grande mano a mano che la sua velocità diminuisce (cioè verso la fine della traiettoria), e così con lo stesso andamento poco a poco aumentano le ionizzazioni. È importante l'osservazione che ad ogni TEL, considerato e rilevato sperimentalmente, corrispondono *particolari effetti* — sia chimici che biologici — ed i *migliori* sono quelli corrispondenti ai TEL compresi fra i 6,5 e i 10 kev/micron — cioè pari a 300 — 1000 ioni per micron (dentro il tratto punteggiato).

A questi valori nella prima colonna della tabella corrispondono alternativamente raggi molli da 1 a 5 kv. e neutroni da ciclotroni da 12 ad 8 Mev., che per gli effetti chimici e radiobiologici si dimostrano all'incirca equivalenti, anche se delle due particelle ionizzanti il protone abbia, a parità di energia, un percorso totale 1750 volte più lungo dell'elettrone.

Invece al di fuori di questi valori sia da una parte verso i raggi X duri, i bett
i gamma con TEL più bassi, sia dall'altra parte verso i raggi alfa e cosmici con
molto alti, *gli effetti chimici e radiobiologici diminuiscono di molto* (GRAY 1955b).

È interessante notare che proprio i raggi X molto molli, come qu
prodotti da tensioni corrispondenti ad 1 e a 5 kV., *resultino i più at
dal punto di vista chimico e radiobiologico*. Un'ulteriore riprova a qua
era già stato sostenuto da qualche A. in base a deduzioni teoriche e
i fenomeni fisici che avvengono in un corpo irradiato e a quanto l'ee
rienza suole dimostrare in esperimenti di questo genere.

Dal punto di vista teorico anch'io ne ho trattato in particola
(CASATI 1950a-1951) quando ho sottolineato la differenza fra energia
tale caduta di un sol colpo in un effetto fotoelettrico e l'energia parza
caduta nella diffusione da effetto Compton.

Tali considerazioni trovano corrispondenza e conferma nella figg

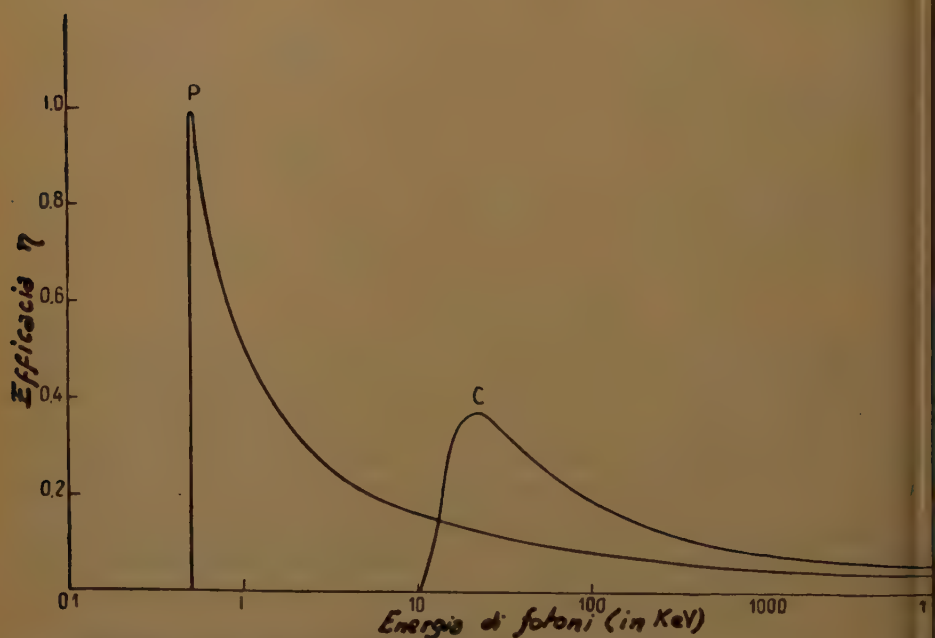


Fig. 6. — Efficacia in funzione dell'energia dei fotoni (da 0,5 Kev.). Curva P: fotoe
troni; curva C: Comptonelettroni (da uno schema di GRAY, in HASSINSKY
vol. I, p. 78).

Ma nel concetto del TEL è ammessa un'altra condizione di imp

anza fondamentale — sulla quale ho più volte insistito, specie nella serie di queste note — e cioè che *questa perdita totale di energia lungo la traiettoria* viene considerata come *energia spesa sia per le ionizzazioni che per le eccitazioni* — presso a poco in parti uguali —, venendo così sottolineata l'importanza che oggi si deve riconoscere anche alle *eccitazioni* per ben spiegarci i vari fenomeni chimici e radiobiologici osservati: con un netto progresso quindi a quanto prima era stato sostenuto e da me in precedenza rilevato (CASATI 1950b) nella critica alla «teoria dell'urto», dove l'energia si considera come totalmente ed esclusivamente spesa per le sole ionizzazioni.

Questa caratteristica del TEL non è sfuggita al GRAY, il quale però acutamente osserva che il TEL *non tien conto della natura discontinua nella perdita di energia*, nel senso che lungo una traiettoria se alcuni atomi sono ionizzati od eccitati in rapporto diretto all'energia della particella e in ragione inversa al quadrato della distanza fra particelle ed elettroni atomici, altri ne restano completamente indenni.

Anche il DALE (1955) sottolinea la grande importanza, che riveste per i fenomeni chimici da radiazioni l'«*inomogeneità*» della *dissipazione dell'energia lungo la traiettoria di una particella ionizzante* — scarsa all'inizio aumenta via via ed intensamente verso la fine della traiettoria, decrescendo invece all'intorno di quella ed in rapporto inverso alla distanza. Secondo i concetti qui sostenuti si vengono così a creare delle «*zone di ordine microfisico*» a *forte dissipazione locale di energia*, come alla fine di ogni traiettoria di particella primaria, che si possono considerare anche sotto l'aspetto della dose-rate (cioè della dose assorbita per secondo, ma qui naturalmente rapportata ai tempi-scoli previsti per simili fenomeni), che tanto condiziona secondo alcuni A.A. le *reazioni chimiche* — «*zonali*» o «*microzonali*» —, i loro *rendimenti* e la loro *velocità di reazione*: una specie di ponte di passaggio fra l'azione fisica e la reazione chimica.

Queste messe a punto sono rilievi di particolare importanza, perchè sono una *conferma*, quanto mai autorevole, della *discontinuità d'azione dei raggi X*, già sostenuta nel formulare l'ipotesi della «*zona d'azione*» (CASATI 1929a).

A questo punto vanno anche ricordati alcuni calcoli del READ (1949, 1951), che riprendendo il noto modello del LEA (cilindro interno con ioni positivi e manicotto esterno con ioni negativi intorno ad una traiettoria di una particella), calcola l'energia immagazzinata in questi campi elettrici intorno alla traiettoria di una particella alfa quando gli elettroni espulsi restino comunque in loco pari a forze meccaniche di circa 10^5 dine/

cm. cubo: se gli atomi ionizzati per es. appartengono ad una fibra di cromosomi, la fibra può essere interrotta.

Sotto questo punto di vista si può considerare anche la possibilità di *rottura di legami chimici* e di *modificazioni delle forze di VAN DER WAALS*.

Si deve poi riconoscere che lo studio del TEL ha spinto le ricerche degli AA. verso la migliore definizione *in senso* « *qualitativo, quantitativo e localistico* » degli « *eventi microfisici* », che avvengono in una sostanza irradiata e che in definitiva sono la base concettuale dell'« *zona d'azione* ».

Quanto di logico e di giusto ci sia nel concetto del TEL lo dimostra lo ZIRKLE in un lavoro importante e ben fatto: « *Influence of linear energy transfer* » (a pag. 315 del vol. dell'HOLLAENDER 1954), revisionando sotto questo punto di vista tutti gli esperimenti chimici e radiobiologici noti (che hanno servito fra l'altro anche alla formulazione della teoria dell'« *urto* ») e riuscendo ad elencare in una tabella (Tav. 6-1 a pag. 328) le variazioni sperimentali osservate, rapportandole ai valori del TEL.

Lo ZIRKLE pone il problema se i mutamenti elencati siano di ordine qualitativo o quantitativo e se *radiazioni con diverso TEL possano dare effetti di sommazione* (additivity) *completi o no*, quantitativi soprattutto ma anche qualitativi, sia per l'effetto finale sia per un effetto intermedio in una delle tante tappe della « *catena dei processi* », che spesso condizionano un effetto da raggi X.

Questa proposizione — sia pure in forma ipotetica — mi sembra di particolare rilievo, perchè in definitiva si basa sulla valutazione criticamente impostata di dati sperimentali noti ed indiscussi e perchè si riattribuisce a quei lavori, in cui si parla di « *effetti variati* », ben conosciuti e riportati in ogni testo: di più può confermare quei concetti deducibili dalla mia espressione « *di meccanismi di vario ordine e natura... che si rinforzano e si annullano...* », cioè per sommazione di effetti non nel senso « *aritmetico* » ma nel senso « *algebrico* » (CASATI), come del resto può essere interpretata l'espressione di « *incomplete additivity* », cioè minori effetti, e a quanto sembra, nel senso quantitativo e non qualitativo.

In questi effetti di « *sommazione* » considerati nel TEL, non si prospetta assolutamente una *contemporaneità di azione*, sulla quale ho voluto insistere nell'ipotesi della « *zona d'azione* »: ma perchè l'energia possa comunque « *sommarsi* », basta che la sostanza irradiata « *non smaltisca di colpo* » l'effetto, come nei fenomeni radiobiologici, dove se ne tien conto per il fattore « *tempo* » nel senso della protrazione e del frazionamento della dose.

La circostanza che il TEL sia un valore medio convenzionale è stata ben superata solo nei casi, nei quali con differenti radiazioni a TEL uguali hanno corrisposto effetti radiobiologici equivalenti: non così quando gli effetti radiobiologici sono stati diversi. Lo studio più accurato del TEL si è subito imposto e non deve meravigliare se ricorrendo anche a calcoli e a formule matematiche.

Di questi accennerò solo ai più importanti e alle parti ritenute utili ai fini e alla comprensione del mio presupposto: ma in forma schematica e riassuntiva, non matematica e senza formule, rimandando senz'altro ai lavori originali.

Così da HOWARD-FLANDERS sono stati calcolati i vari spettri del TEL e riportati su scala logaritmica riuniti in un diagramma (fig. 7). Chiara si è dimostrata per i raggi X e per i neutroni da 8 e da 12 Mev, la posizione del loro spettro fra i 6,5 e i 25 K ev/ μ , che dal punto di vista chimico e radiobiologico sono i più attivi: a sinistra si trovano gli spettri da particelle alfa e a destra quelli da raggi gamma del Co^{60} .

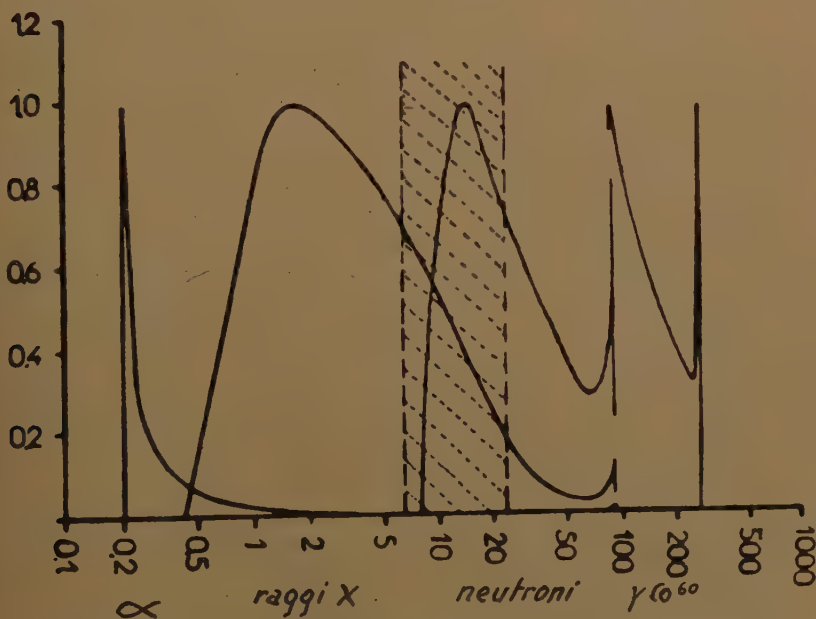


Fig. 7. — Spettri del TEL. Ascisse TEL in keV/ μ su scala logaritmica: ordinate energia assorbita per unità di intervallo di (log. di TEL). I tratti verticali tratteggiati definiscono la «zona di transizione» (o delle massime variazioni degli effetti radiochimici) scavalcata dai soli raggi X e dai neutroni da 8 a 12 Mev. (riportata dal GRAY, 1955b, p. 520).

Il GRAY poi ha utilizzato le funzioni di distribuzione, che danno la lunghezza totale

delle traiettorie e l'energia totale, associata a particelle, il cui tasso di perdita di energia si trova in un intervallo definito di valore.

L'importanza di questi calcoli sta nell'aver *determinato* un valore assoluto (il numero di arresto) partendo da basi quantistico-meccaniche cioè indeterministiche e nello stesso tempo nell'aver impostato un calcolo *su basi localistiche e volumetriche*, in quanto considera l'orbita spaziale, ossia quell'autofunzione valutata secondo HARTREE, che è matematicamente relativa alle tre variabili spaziali (x, y, z) e al tempo. Il che vuol dire che è impossibile astrarsi anche nei calcoli dal *volumetrico spaziale*.

Nello stesso tempo riprendendo alcuni studi del WILLIAMS (1933), si è tentato di precisare « localisticamente » i singoli vari eventi calcolando la presunta distanza delle ionizzazioni e delle eccitazioni dalla traiettoria geometrica di un elettrone — alias raggio d'azione, per es. all'incirca 2 $m\mu$ con un elettrone da 100 kV. e 50 $m\mu$ con un elettrone di 10 Mev — e quindi risalire al « volume » che tutte le comprenda, cioè *ad un cilindro* che rappresenta secondo i concetti da me sostenuti, una chiara « zona d'azione ».

Se per le eccitazioni finora ci si limita ad ammetterne la presenza e l'importanza — non potendo con ricerche sperimentali studiare gli effetti da sole eccitazioni —, per lo studio delle ionizzazioni si è voluto specificare più particolarmente.

Intanto si è confermata la *diversità degli effetti* in base alla *relativa percentuale* dei *fotoelettroni e dei Comptonelettroni* nella sostanza irradiata secondo i vari voltaggi.

Il GRAY, che ha molto lavorato su questo argomento, dallo studio dell'efficacia di insieme degli elettroni — la cosiddetta η — per assorbimento di raggi X monocromatici di varia energia nell'esano, nell'acqua e nel cloroformio, ha potuto dimostrare che le singole quote-assorbimento fotoelettrico e quote-assorbimento Comptonelettroni variano diversamente nelle sostanze ricordate ai vari voltaggi e ne dà una tavola riassuntiva (v. pag. 79 dell'HAUSSINSKY 1955) basandosi sui relativi grafici (la fig. 6 soprariportata rappresenta appunto uno di questi con energia di 0,5 KeV).

Di massima risulta chiaramente che *gli effetti sono tanto maggiori, quanto maggiore è la quota-assorbimento dei fotoelettroni*.

Di più ci dà il relativo diagramma di efficacia media dei foto- e dei Comptonelettroni — considerati agenti insieme — nelle tre sostanze ricordate e riporto quello calcolato per energie comprese fra 0,5 e 3,0 KeV (fig. 8).

Infine l'A. ha voluto elencare i *vari eventi secondari*, che si producono lungo una traiettoria di grande energia proponendone una classificazione, che riconosce arbitrariamente ma tuttavia utile ai fini della comprensione dei fenomeni e cioè 1) gruppi di ioni; 2) raggi δ ; 3) transizione senza irradiazione (effetto Auger); 4) associazione a caso di gruppi di ioni.

Interessantissimi sono risultati i raggi δ — alias elettroni lenti —, energeticamente

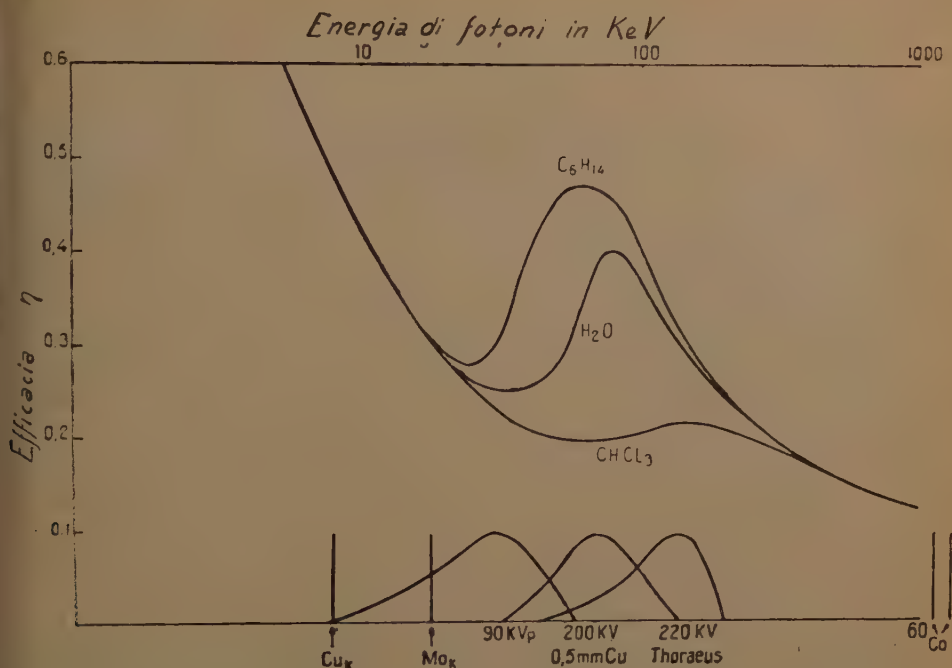


Fig. 8. — Efficacia media dei fotoelettroni e dei Comptonelettroni provenienti dall'assorbimento di raggi X monocromatici nell'esano, nell'acqua e nel cloroformio (dal GRAY, in HAISSINSKY 1955, p. 81).

i più efficaci di tutti, che si formano con differenti radiazioni, data anche l'alta probabilità di questi eventi in rapporto alla scarsa energia dissipata capace di produrli. L'A. con i suoi calcoli ha potuto stabilirne anche i valori cosiddetti utili ed efficaci e darcene la raffigurazione su un piano delle singole traiettorie (fig. 9). L'A. commentandola fa notare che la somma di energia dei due raggi A-B e C-D è uguale all'energia totale associata alle porzioni delle traiettorie dei raggi E-B, F-D, P-Q, R-S, T-W e richiama l'attenzione che la cessione di energia più importante risiede alla fine della traiettoria, quando l'energia della particella primaria è fortemente diminuita a bassi valori utili ai fini dell'assorbimento, cioè con TEL fra i 6,5 e i 25 Kev/ μ o vicini a tali limiti. Richiamandomi alla fig. 4a la « zona » di maggior efficacia corrisponde dunque all'ultimo tratto — il 5 —, dove si ammette che si formi un fotoelettrone.

Tali eventi hanno come caratteri comuni, la brevità delle loro traiettorie paragonate alla traiettoria della particella primaria e la loro relativamente bassa energia, che creano perciò locali e localizzate cessioni

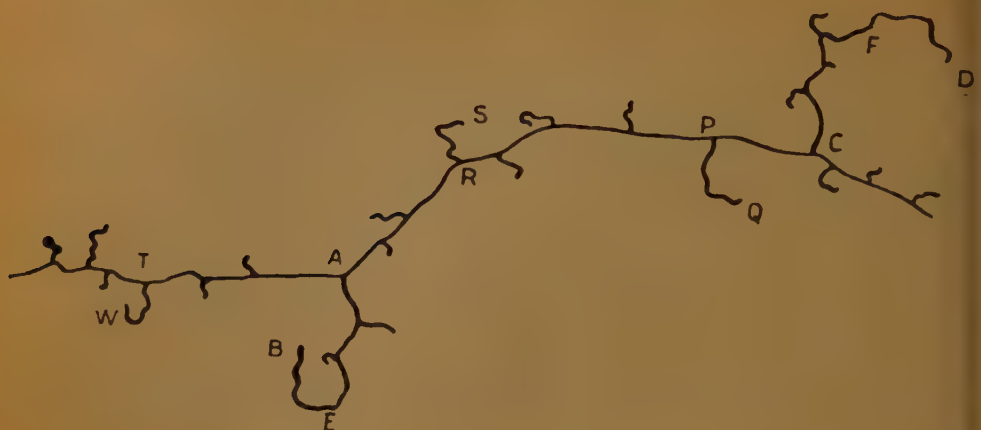


Fig. 9. — Diagramma rappresentante i raggi δ risultanti dai grandi trasporti di energia di un elettrone rapido (dal GRAY, in HAISSINSKY, p. 77).

energetiche, da valutare nel computo della dose totale e nella resa degli effetti, poichè in ultima analisi sono quelle più efficaci dal punto di vista del rendimento.

Quindi va tenuto ben presente che tutte le particelle o i fotoni di alta energia agiscono *soprattutto attraverso fenomeni secondari energeticamente i più efficaci*.

Inoltre da quanto ho brevemente riportato anche *sotto il punto di vista dell'energia localmente ceduta o dissipata*, dalle particelle primarie o dagli eventi secondari, *il concetto localistico*, inteso sotto forma di « volume spaziale » e quindi di « zona d'azione », vi domina incontrastato ed indiscusso.

Ed eccone le conclusioni, che traduco integralmente dal GRAY :

« È utile presentare i dati fisici in uno spazio tridimensionale, in termine di funzioni di distribuzione, prima della dose e poi della concentrazione in ioni molecolari. Le funzioni di distribuzione della dose costituiscono una famiglia di curve, dove ciascuna darà la distribuzione numero-energia per degli elementi di dimensioni date. A scala macroscopica la funzione di distribuzione mostrerà tutti gli elementi di volume, che sono la sede di una dissipazione di energia. All'altra estremità inversa, la funzione di distribuzione costituirà effettivamente uno spettro di eccitazione appropriato a ciascuna specie atomica. Entro questi due estremi si troveranno le funzioni particolarmente interessanti per le

quali l'unità di volume avrà le dimensioni fisiche di un grappolo di ioni o delle più piccole unità dell'organizzazione biologica ».

Riassumendo possiamo dire che anche studiando dal punto di vista energetico le « traiettorie » delle varie particelle primarie e degli eventi fisici secondari come distribuzione di energia ceduta per unità di lunghezza secondo il concetto del TEL, si arriva alla determinazione « localistica e spaziale » dell'energia ceduta e dissipata, alla quale in ultima analisi spetta la determinazione degli effetti osservabili : il che concorda perfettamente con il concetto fondamentale della « zona d'azione », tanto più che si accenna anche ad un effetto di « sommazione » d'azione da parte di radiazioni con diverso TEL, in armonia alla supposizione fondamentale della « zona d'azione » che « gli effetti osservati siano la risultanza di tutte le energie in gioco in una zona d'azione ».

III. LA « ZONA D'AZIONE » DAL PUNTO DI VISTA CHIMICO ⁽³⁾.

L'introduzione allo studio della « zona d'azione » dal punto di vista chimico può ritrovarsi in lavori di anni fa, concernenti una questione, che ha acquistato oggi una particolare importanza : cioè determinare in un mezzo liquido con la maggior precisione possibile, quello che avviene degli elettroni espulsi da un atomo, quando, dopo aver percorso una traiettoria e perduta gran parte della loro energia per l'incontro con le varie molecole, non sono più capaci di produrre altre ionizzazioni e finiscono per accollarsi ad un atomo o ad una molecola, avendosi così un ione negativo a breve distanza dal corrispondente ione positivo : questa breve distanza non rappresenta che la traiettoria degli elettroni espulsi.

Tale problema era già stato affrontato per i gas da JAFFÉ (1913), perchè la distanza media che separa gli ioni positivi dagli elettroni espulsi, nel momento che rallentati raggiungono le cosiddette « velocità termiche », è risultato un fattore importante per la determinazione della grandezza di quel campo elettrico, necessario per comprendervi tutti gli ioni prodotti; detto A. partendo dal presupposto che gli ioni positivi e negativi abbiano al loro formarsi una distribuzione di GAUSS, attraverso lo sviluppo di una formula arrivò a correlare il numero degli ioni raccolti alla grandezza del campo.

(3) Comunicato al 46° Raduno dei Radiologi Tosco-Umbri. Firenze, Febbraio 1958.

In detta formula vi figura una costante b , che misura la larghezza dell'ammasso della colonna degli ioni.

Mi sembra logico rimarcare subito l'analogia fra questo campo elettrico inteso come spazio — dove si considerano tutti gli ioni che si formano per effetto di una radiazione — e la «zona d'azione».

Il concetto «spaziale» nel senso fisico vi è chiaro ed indiscutibile sia che lo si intenda — secondo detti AA. — come la sede o la «zona» di tutti ma dei soli ioni primari prodotti dall'irradiazione oppure come quella «figura geometrica» — secondo quanto ho sempre sostenuto fin dal 1929 —, che comprenda anche tutte le traiettorie degli elettroni con i relativi eventi fisici e chimici secondari.

Però le caratteristiche e gli attributi di una «zona di effetti» sono chiari nell'un caso e nell'altro. Il che è importante.

La formula di JAFFÉ fu confermata da LEA (1946): ma detto A. considera che gli ioni si formino a grappolo (*ion cluster* o *nubecola ionica*), invece che a colonna.

In accordo a questi dati presunti sono poi seguite per i gas le verifiche sperimentali di KARA-MICHAILOVA e LEA (1940), risultando ancora una volta l'importanza della natura del gas in studio, già affermata dal KLEMPERER (1927), che stabilì come il raggio della colonna di ioni negativi nell'idrogeno gassoso fosse uguale a 0.002 cm. d'aria a pressione atmosferica, riducendosi di molto in presenza di minime tracce di O. Nel CO_2 i ricordati AA. trovano per es. un valore di 0,0005 cm. ed in aria un valore di 0,0001 cm., riconfermando l'affinità delle molecole gassose per l'elettrone — simile all'«elettroneaffinità» (CASATI 1956) nel senso precisato.

Per i gas liquidi detto calcolo è stato criticato dal GERRITSEN (1948) ma risulta valido per i liquidi come l'esano, onde LEA credette applicarlo all'acqua deducendo detto valore di b pari a 15 μ circa.

GRAY (1954), secondo questi dati ha potuto costruire gli schemi grafici della distribuzione iniziale degli ioni positivi e negativi nell'acqua (sembra non degazificata) intorno alla traiettoria di una particella alfa, di un elettrone lento e di un elettrone rapido. LEA (1947) d'altra parte ha proposto il suo ben noto schema, da cui risulta che intorno all'asse della traiettoria di una particella alfa si notano due regioni dello spazio ben distinte, una colonna centrale dove gli ioni positivi sono predominanti ed una zona circonferenziale di ioni negativi: il tutto a forma di «cilindro» (fig. 10).

Qui conviene un poco soffermarsi sulla quantità e sulla qualità di questi «ioni positivi e negativi», perchè da questi dipende e si arriva al calcolo della posizione spaziale degli atomi H^+ e dei radicali OH^+ .

Circa la quantità si è dimostrata la varia densità degli ioni idrogeno lungo la traiettoria delle particelle ionizzanti, che è massima per le α ,

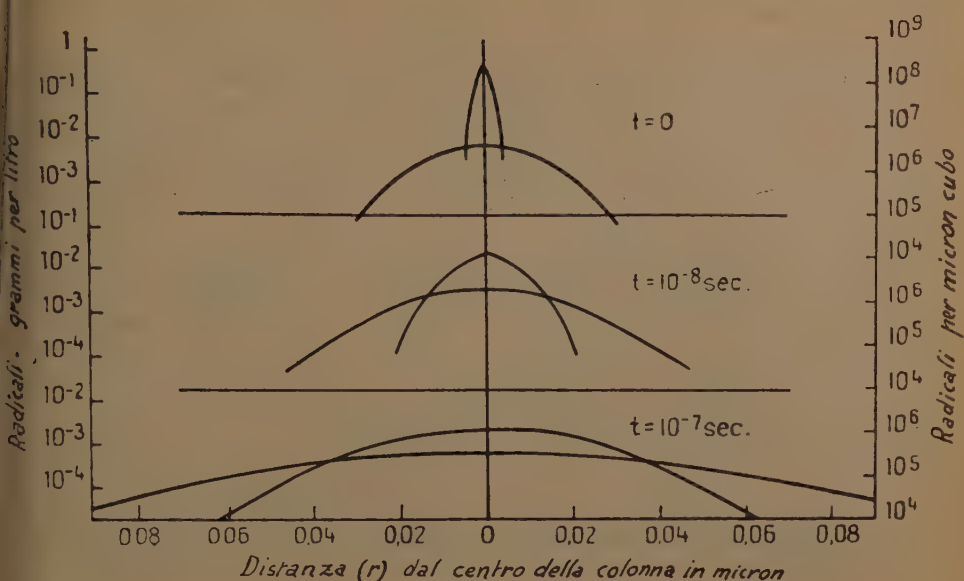


Fig. 10. — Calcolo della distribuzione degli atomi H e dei radicali OH intorno all'asse d'una traiettoria di un raggio alfa al momento della loro formazione a 10^{-8} e a 10^{-7} secondi dopo (da LEA 1947, p. 60).

minore per gli elettroni e via via diminuite con la loro energia, ammettendone la grande importanza :

a) per l'estensione del campo di separazione fra le regioni contenenti ioni positivi ed ioni negativi — inversamente proporzionale alla densità ionica;

b) per l'intensità del detto campo elettrico — direttamente proporzionale alla densità ionica lineare e quindi l'energia immagazzinata in questo campo è proporzionale al quadrato della densità ionica (READ);

c) per le trasformazioni chimiche eventuali — per es. la forte densità ionica di ioni idrogeno lungo la traiettoria di una particella α favorisce la formazione di atomi di idrogeno (reazione R) e quindi di idrogeno molecolare (reazione M): mentre la scarsa densità ionica sulla traiettoria degli elettroni rapidi favorisce le « reazioni chimiche secondarie » con le molecole dei soluti rispetto al solvente.

A questo riguardo circa le eventuali reazioni chimiche dei soluti LEA fin dal 1946 ha voluto specificare che tali reazioni avvengono per urto di una molecola con un radicale libero, che si elimina: ma ha

insistito sul caso che una molecola in seguito ad un urto di un radicale che scompare, possa anche non modificarsi.

Inoltre LEA ha cercato ancor più di precisare prendendo in considerazione il numero delle molecole del soluto ed il numero dei radicali attivi in un *cm. cubo* delimitazione spaziale tridimensionale, quindi «zona d'azione». È ovvio che con un numero maggiore di molecole e di radicali gli urti siano più frequenti.

Ma è interessante ricordare che con una forte densità di radicali attivi, questi tendono per azione «competitiva» soprattutto a reagire fra loro, eliminandosi, senza urtare o reagire con le molecole del soluto, perciò il paradosso che il rendimento di una reazione può essere maggiore a scarsa densità di radicali attivi.

Nella definizione della «zona d'azione» si direbbe che *tutto questo avviene per «meccanismi... che si annullano...»*.

Il che non infirma il concetto fondamentale che in una «zona» comunque intesa, perchè avvenga una reazione deve esserci *quel dato numero o quella data densità* di molecole reagenti e di radicali attivi.

Quindi si deve apprezzare in tutto il suo valore l'ammissione del GRAY, quando parla delle «grandi differenze locali nella concentrazione degli ioni idrogeno»: ripresa poi dal LÉFORT (1950) con l'espressione «répartition locale» degli ioni (e quindi dei radicali lungo le traiettorie delle particelle ionizzanti) e da WEISS (1955), quando nelle sue formule considera un *n* o *numero di elettroni per unità di volume* relativo alla concentrazione *locale* degli elettroni intorno alle traiettorie delle particelle ionizzanti e da BAXENDALE (1952), quando sostiene che la riduzione del Fe^{+++} avvenga in «quelle zone con sufficiente concentrazione di ioni ferrici e con grande densità di radicali liberi» e da ALLEN (1952) con l'ammissione di una «*varia densità di ionizzazione parzialmente inhomogenea*», come prestadio alle sue reazioni radicalari (R) e reazioni molecolari (F o anticipata ed E o ritardata), onde l'ipotesi dei cosiddetti «hot spots» (punti caldi) — cioè la *presenza di «little regions»* con forte densità ionica — e da DE WURST, SAMUEL e MAGEE (1954) con l'identico concetto degli «spurs», cioè la «zona» dove si diffonde l'energia del processo primario, quando la si consideri come «sede» dei radicali liberi che vi prendono origine e che secondo la densità si combinano subito fra loro o si diffondono con possibilità di altre «azioni secondarie»: infine sottintesa nell'ipotesi del NOYES (1951), quando accenna alla «ricombinazione primaria» dei radicali di una molecola dissociata nella cosiddetta *cage* cioè dentro i limiti «spaziali» di un diametro molecolare e documentata dal GRAY nei suoi calcoli matematici intorno al TEL (1955).

Infatti detto A., dopo aver definito la cosiddetta η o « efficacia d'insieme di una reazione », relativa alla formazione di prodotti molecolari, come il rapporto fra la quantità di energia dissipata da elettroni con una data e prefissata energia (soprattutto « lenti ») l'energia totale dissipata da tutte le particelle ionizzanti, ne ha dati i relativi diametri rispetto al TEL, riconfermando il concetto che solo « la distanza di separazione degli ioni, delle molecole e dei radicali determina principalmente le reazioni chimiche che ne seguono ».

Quindi ha importanza la loro « distribuzione » — oppure anche il loro « raggruppamento » — in determinate « zone », che l'A. cerca di collegare con una serie di « funzioni di distribuzione » per ogni data energia.

Infine è stato sostenuto che gli ioni positivi — ritenuti essenzialmente ossidanti — sono più uniformemente distribuiti dei negativi, ritenuti eventualmente riducenti.

Mi sembra che *tutte queste precisazioni*, oramai ammesse ed accettate, rientrano con facilità e senza eccezioni nella « zona d'azione ».

Circa la *qualità* bisogna distinguere se si tratti di acqua o di una soluzione acquosa di una data sostanza o di altro composto.

Per l'acqua tutti gli AA. sono concordi nell'ammettere che l'azione dei raggi X inizialmente — cioè al cosiddetto tempo 0 — consiste nell'ionizzazione di una molecola d'acqua con la formazione di un H_2O^+ . Ma questi ioni positivi non rimangono tali chimicamente, nè restano in situ (nella « cage » come direbbe Noyes), perchè nei tempuscoli immediatamente successivi — sull'ordine di un 10^{-9} di secondo — si ha la dissociazione (gli altri AA. dicono scissione e credo opportuno insisterci) dell' H_2O^+

in $\rightarrow OH^\cdot + H^+$ e quindi di $H^+ + e$ in $\rightarrow H^\cdot$ (reazione R)

la loro « ricombinazione primaria » nella « cage » o nelle immediate vicinanze, se in sufficiente « densità locale »

$H^\cdot + H^\cdot \rightarrow H_2$ e magari $OH^\cdot + OH^\cdot \rightarrow H_2O_2$ (reazione M)

oppure la varia diffusione dei radicali con possibilità di altre « combinazioni secondarie », fuori della « cage », cioè a minore o maggiore distanza dalla traiettoria delle particelle ionizzanti. I ricordati schemi del GRAY e del LEA ci presentano graficamente questa diffusione.

Perciò in queste varie e numerose « zone » si trovano, via via localizzati e raggruppati in tempuscoli brevissimi successivi, ioni, radicali e prodotti molecolari — H_2O , H_2O_2 — e poichè questi consensualmente « si diffondono », anche i limiti di dette « zone » allargano proporzionalmente e quindi possibili anche le cosiddette « Back Reactions »

$H + H_2O_2 \rightarrow H_2O + OH$ e $OH + H_2 \rightarrow H_2O + H$.

Difficile, per non dire impossibile, precisare di più, anche considerando che all'intorno di una « zona » a forte densità di ioni — quale

lungo una traiettoria di particelle ionizzanti — si ammette la presenza di un « campo » molto più largo, dove le molecole d'acqua vengono eccitate, capaci quindi di scindersi nei due radicali $H\cdot$ e $OH\cdot$.

Tutto questo non è che una conferma alla *diversa distribuzione iniziale « a zone » degli effetti* — qui chimici — da raggi X e alla *moltitudine di dette « zone d'azione »*, supposizioni che sono fondamentali per la mia ipotesi formulata. Tanto più che queste « zone » sono intese e giustamente, come piccole rispetto al volume totale della sostanza irradiata, sia che vengano considerate singolarmente, a sè stanti, o ne l'insieme, cioè sommate.

Quando poi si tratti di una *soluzione acquosa* con presenza di ioni valgono le concordate osservazioni di LEA e di BAXENDALE, che posso confermare per la riduzione del solfocianato ferrico — ammettendo il distacco dell'elettrone riduttore da una molecola d'acqua di solvatazione — e la riduzione del cloruro mercurico in cloruro mercurioso, i cui prodotti intermedi prospettati debbono essere sufficientemente concentrati e a contatto per formare il nuovo legame $Cl-Hg-Hg-Cl$ (CASATI 1958).

Io credo che secondo questo schema di ragionamento ci si possa orientare per quasi tutte le varie reazioni note in chimica da radiazioni tanto più ricorrendo *alla strutturistica delle varie sostanze in gioco*, magari tenendo conto anche della loro *radiosensibilità*, nel senso da me già specificato (CASATI 1928). Il che giustifica la mia affermazione che la « zona d'azione » dovrebbe essere *un parametro di ordine concettuale generale*.

Inoltre la « zona d'azione », lungi dall'essere solamente « statica » in queste condizioni sperimentali può essere anche considerata « dinamica » sotto due particolari punti di vista: e cioè *volumetrico*, nel senso della progressione delle sue dimensioni per la diffusione degli ioni e dei radicali dalla traiettoria, luogo di origine, — che giustifica la mia espressione volutamente generica « *dall'ambito microfisico all'ambito cellulare* » da completarsi con « *e all'ambito molecolare* » e che trova corrispondenza in un'espressione analoga del LÉFORT « *chaque volume réactionnel* » — ed in fine *reattivo* cioè di *effetti* — chimici in questo caso —, perché dalla produzione di ioni si arriva alla formazione di radicali e di molecole, con un vario meccanismo e con una varia intensità spaziale in dipendenza del raggrupparsi in una « zona » dei vari prodotti iniziali secondari, atti a reagire.

Si ammette infine che la ricombinazione dei radicali sia meno rapida di quella degli ioni per una data « distribuzione spaziale », adducendo che « non vi è attrazione al di là di una certa distanza ».

Il che in altre parole vuole anche significare che solo con una data concentrazione « *in quel dato volume* » si possono ottenere quelle date azioni chimiche.

Tanto è vero che le « funzioni di distribuzione » in rapporto alla formazione di prodotti molecolari comporta:

- a) una serie di funzioni che descrivono in quali proporzioni le varie specie x siano comprese fra $x+dx$;
- b) una serie di funzioni che descrivono in quali proporzioni le varie specie x hanno probabilità di choc nell'unità di tempo con x , y etc.;
- c) una serie di funzioni di partizione (GRAY 1955).

Ma va anche ricordato che gli ioni e i radicali *se eccitati* si ricombinano più facilmente, perchè durante i tempi infinitesimali dell'eccitazione i due ioni e i due radicali possono reagire « anche a distanze maggiori delle minime ammesse e sperimentate »: quindi è di grande importanza *l'azione dell'energia radiante continuata nel tempo*, poichè può rispondervi un numero proporzionalmente maggiore di eccitazioni: che può trovare una certa analogia e corrispondenza al modo di intendere il concetto della dose assorbita come una misura della probabilità che una qualsiasi superficie scelta sia attraversata da una particella ionizzante (dando luogo ad un'ionizzazione o ad un'eccitazione) e al modo di intendere il concetto della dose assorbita per secondo (dose rate) e l'inverso del tempo che separa due avvenimenti ionizzanti (o casi di eccitare), prodotti da due differenti particelle.

Perciò il fattore *tempo* va considerato non solo come « tempo di irradiazione » ma anche come « *somma dei vari tempuscoli d'azione* »: tutto questo può rientrare in quei limiti di tempo espressi nella mia definizione di « zona d'azione » con l'avverbio « contemporaneamente », a significare molto lato ma che comunque vengo qui a ribadire.

Riassumendo, la « zona d'azione » trova conferma negli studi e nella eliminazione di quel campo elettrico comprendente tutti gli ioni primari prodotti da un'irradiazione (JAFFÉ e LEA). E nel campo più propriamente chimico nel calcolo della ripartizione degli ioni stessi secondo il campo elettrico (LEA e GRAY), capaci di determinare le « azioni chimiche secondarie » (CASATI): così si trovano nella letteratura espressioni come « *répartition locale des ions* » (LÉFORT), « *hot spots* » (ALLEN), « *clusters* » (SAMUEL e MAGEE), « *grappes* » (BURTON), « *ion cluster* » (LEA), « *spots* » (NOYES), che vogliono indicare comunque un « volume » od una « zona », dove seguono le azioni chimiche secondarie, che sono stretta-

mente dipendenti dalla concentrazione non solo dei vari ioni ma anche dei radicali e delle molecole o dalla loro reciproca distanza di separazione (secondo i calcoli del GRAY).

IV. LA « ZONA D'AZIONE » DAL PUNTO DI VISTA ISTOLOGICO ⁽⁴⁾.

Applicare i concetti della « zona d'azione » in campo istologico, o dire portarsi su terreno radiobiologico, la cui importanza per i nostri fini è inutile sottolineare: quanto sono venuto esponendo può consigliarsi la preparazione per questa messa a punto.

Ma subito si affaccia spontanea una pregiudiziale, posta dagli istologi — v. per es.: PROTTI (1956), SIRTORI (1958) — che non possiamo ignorare o sottovalutare: si debbono considerare anche i quadri da microscopio elettronico?

Indipendentemente dal valore oggi riconosciuto alle prime acquisizioni di questa nuova metodica, che mettono in discussione tutta l'istologia cellulare classica con lo studio in dettaglio delle ultrastrutture degli organuli cellulari, è ovvio che per un radiobiologo, uso a considerare fenomeni che avvengono su scala atomica (o molecolare), i quadri elettromicroscopici, con ingrandimenti delle immagini dell'ordine e di grandezza di centinaia di Å, ci avvicinano, come mai fino ad ora, a « volumi «spaziali» intravisti nei calcoli e già ricordati.

La membrana cellulare ha uno spessore di 80 Å: la membrana nucleare da 50 a 1.200 Å: i cromosomi — siano filamenti o tubuli — hanno un diametro di 500-2.000 Å: l'apparato nucleolare è un grosso filamento formato da tanti granuli di 100-200 Å: la distanza fra cellula e cellula da 50 a 300 Å ecc. Gli ingrandimenti sono pari a decine di migliaia di volte, aumentabili con mezzi ottici fino a 300.000 volte (v. per es.: ROBERTS 1955).

Nel microscopio ottico il potere di risoluzione non oltrepassa lo 0,1 μ e gli ingrandimenti corrispondono a qualche migliaio di volte.

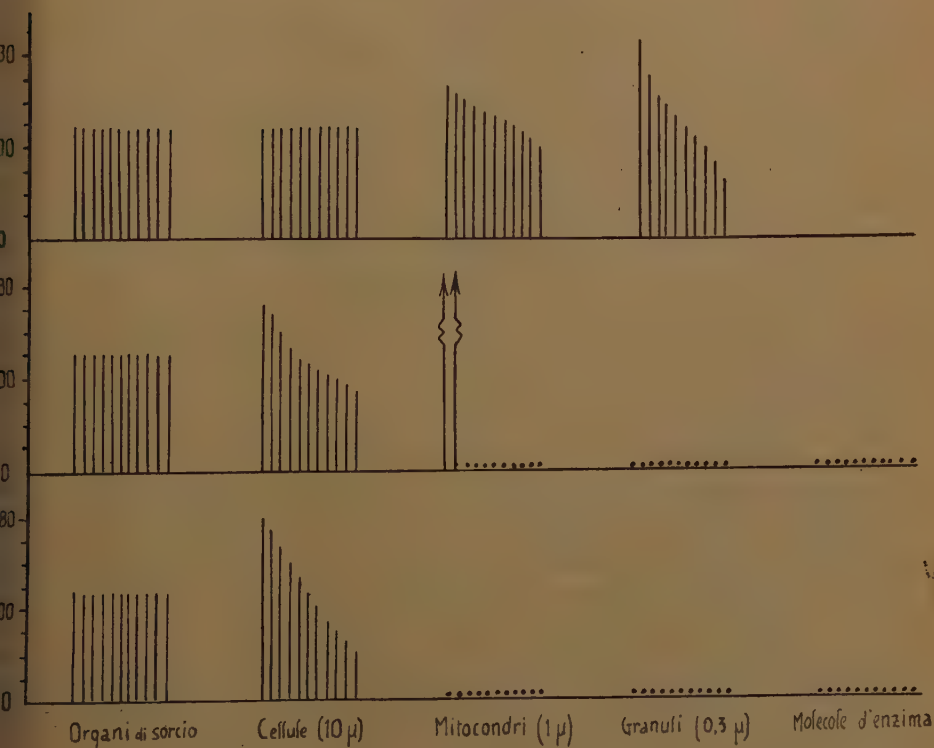
Ammessa così l'utilità nel campo radiobiologico di servirci di quadri elettromicroscopici, con le riserve del caso, non si possono trascurare i risultati istologici ottici già acquisiti. Credo opportuna per questa posizione di giusto mezzo.

Per quanto qui si tratta è ovvio che la cellula e i suoi componenti vanno considerati « volumetricamente » nelle varie direzioni spaziali:

(4) Comunicato all'Accademia Medico-Fisica di Firenze, Dicembre 1959.

ando LEVI (1954) il volume delle cellule varia da 200 a 1500 μ^3 . Ora nessun'altra riproduzione come una tavola di preparato elettromicroscopico ci permette riferimenti e rapporti « volumetrici » più interessanti e particolareggiati da poter « localisticamente » raffigurarci i vari centri micro-energetici, ammessi oggi alla base delle alterazioni istologicamente rilevabili.

Così se teniamo presenti i « ranges » delle particelle ionizzanti, possiamo ricostruire entro una cellula ad ingrandimento elettromicroscopico le singole traiettorie e secondo il loro percorso determinare eventualmente anche i vari organuli colpiti: se ci proiettiamo tutte le varie possibili traiettorie attraverso una cellula, possiamo risalire al « volume totale » formato da tutte le traiettorie secondo lo ZIRKLE e, considerando l'intreccio e la sovrapposizione, rappresentarci concettualmente anche le eventuali zone d'azione: se consideriamo in ogni traiettoria la densità ionica lineare — sotto



11. — Energia dissipata per grammo in ciascuna delle 10 parti di un tessuto di dimensioni varie, durante l'irradiazione d'una notevole massa di questo tessuto con una dose di 100 rads di raggi X, neutroni e particelle alfa (da GRAY 1954, p. 208).

forma di spurs, grappes, volumi associati etc. —, ci possiamo raffigurare la corrispondenza volumetrico-spaziale dell'energia dissipata od assorbita, come già dimostrato in fig. 11, circa le variazioni dell'energia assorbita in strutture di differenti dimensioni esposte a 100 rads di raggi X, di neutroni e di particelle alfa.

Quindi questa prospettata raffigurazione spaziale di eventi micro-fisici su scala elettromicroscopica può essere quanto mai utile, anzi necessaria concettuale logica e non una ricostruzione arbitraria e sui generis, perchè gli eventi microfisici sono la prima causa ed il primo movens delle alterazioni istologiche cellulari; anzi *tali alterazioni vanno riportate agli eventi microfisici*, che le provocano e così inquadrare e interpretate. Concetto accettato su scala microscopica ottica dal RAJEWSKY (1959) (fig. 12) e sottinteso dal GRAY, quando afferma perfino (

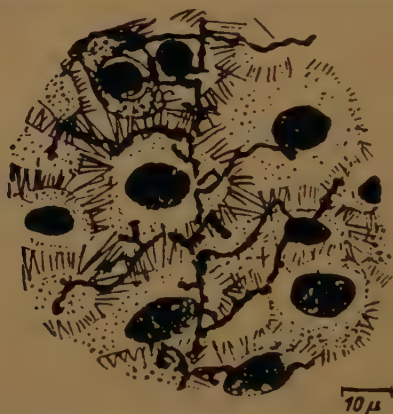


Fig. 12. — Traiettorie di elettroni nel tessuto epiteliale di uomo (da RAJEWSKY e GRAY, 1959, p. 27).

in un'irradiazione totale di un animale, le variazioni di quantità di energia, ricevute nei differenti organi, sono scarse, mentre solo a livello delle singole cellule le variazioni si fanno ben percepibili; è il concetto della «forte dissipazione locale di energia» ed in questo caso *la cellula rappresenta una «zona d'azione» rispetto all'organo, come un organo intero leso è una «zona d'azione» rispetto alla cellula.*

La grandezza degli organuli ha la sua importanza per il determinismo degli eventi microfisici in senso «localistico», naturalmente rapportata al «ranges» delle particelle ionizzanti.

Per il nucleo è stato affermato che la possibilità statistica di lesioni in una «popolazione di nuclei» è alta, quando si usino raggi X, capaci di dar origine ad elettroni con percorso leggermente inferiore alle dimensioni del nucleo con discreto numero

args/gr. dissipati, è bassa, quando si usino particelle alfa, a brevissimo percorso e a forte ionizzazione, che possono esaurire la loro energia dentro una cellula, senza arrivare a colpire il nucleo.

Ma anche dentro uno stesso nucleo gli eventi possono essere variamente localizzati: così ancora il GRAY, commentando i classici diagrammi delle « sopravvivenze » in esperimenti radiobiologici, parla di effetti « monotopici », « bitopici » e pluritopici, invece che di effetti « ad uno » o « a più urti ».

Molto interessante è la produzione di « rotture » di cromosomi e di cromatidi nell'interfase e all'inizio della profase, che possono essere singole o plurime, differenzialmente localizzate, a seconda della o delle traiettorie di una o più particelle ionizzanti: LEA (1947) ammette che una particella ionizzante possa produrre anche due rotture, non l'una di là di un micron di distanza, basandosi sull'eventualità degli interscambi cromosomici.

Gli effetti sono classificabili come « primari », secondo i ben noti concetti di ALBERTI e POLITZER (1923-1924), con un meccanismo diretto. Fa parte a sé la rottura di due cromatidi allo stesso livello (rotture isocromatidiche), dovute al fatto che un cromosoma viene interrotto prima di duplicarsi e così trasmette la sua « rottura » ai due cromatidi figli.

KAUFMANN (1941) arriva all'interessante conclusione che la « rottura » di un cromosoma più che ad una singola ionizzazione sia dovuta a più ionizzazioni — l'ion cluster o grappoli di ionizzazioni —, sia pure prodotti da una singola particella lungo o al termine della sua traiettoria o tanto meglio in una zona di larga concentrazione di energia derivante da più « grappes » di ionizzazioni, il che è quanto dire in una « zona d'azione ».

Queste « rotture cromosomiche », considerate dal punto di vista strettamente « fisico » di danno « locale », rappresentano perciò una conferma istologica sperimentale di quanto qui si sostiene: per la buona colorabilità dei cromosomi — in particolar modo della cromatina nucleare, ricca di acido desossiribonucleico (l'ADN) — sono di facile rilievo e, fino ad un certo punto, di semplice interpretazione.

Ma oggi grazie alle nuove tecniche usate nelle ricerche istologiche, e odierne cognizioni di citologia generale sono tali che ci permettono di poter arrivare, per quello che qui ci interessa, a precisazioni « localistiche » più fini e particolari, purchè si tenga presente quanto segue.

L'ADN è ben colorabile, Feulgen positivo, fortemente assorbente in alcune zone dell'U.V. Dal punto di vista chimico sono ben noti i suoi componenti — lo zucchero (il desossiribosio), la catena fosfatica, le quattro basi (due pirimidine — citosina e timina —, due purine — adenina e guanina): la combinazione zucchero-base si chiama nucleoside, l'estere fosforico di questo, nucleotide: quattro nucleotidi — ognuno con una singola base — formano il tetranucleotide fondamentale. Questo è l'elemento-base dell'ADN,

che è un polimero ad alto peso molecolare e ad alto e vario grado di polimerizzazione le quattro basi nella serie si seguono nello stesso ordine. Sotto la comune denominazione di ADN vanno intesi numerosi e vari polimeri di questa natura, ma per i singoli differenti tessuti di una stessa specie l'ADN è fisso, determinato, costante.

È di complessa ed asimmetrica organizzazione: già il tetranucleotide elementare la formula stereochimica dimostra di avere ciascuna base ed il desossiribosio complanari formanti un ellissoide, mentre la catena fosforica è a questo perpendicolare (SCOTT 1948) e la molecola è più o meno lunga e sottile a seconda del maggiore o minore contenuto di acqua.

Ora l'ADN nucleare si presenta all'indagine con i raggi X come una catena di tetranucleotidi, formanti una fibra più o meno lunga secondo il grado di polimerizzazione, in cui le quattro basi si seguono in un ordine costante e preciso, a distanze fisse ed il cui spessore è pari allo spessore di due nucleotidi complanari. Questo il fondamentale sperimentale che ha suggerito a WATSON e CRICK (1953 e seg.) la loro ipotesi sulla costituzione dell'ADN. Che si tratti cioè di due catene laterali «zucchero-P», parallele e svolgentisi a spirale destrogira intorno ad un asse immaginario (v. fig. 13), riunite



Fig. 13. — Schema della struttura di una molecola di ADN. I due «nastri» rappresentano le due catene «zucchero-fosfato» ed i tratti orizzontali i legami «base-base», che mantengono la struttura (da WATSON e CRICK, in DE GROUCHY 1958, p. 27).

insieme trasversalmente da un paio di basi in accoppiamento fisso e costante, consequenziale, — una pirimidina ed una purina (timina-adenosina, citosina-guanina) e non altrimenti — ciascuna appartenente ad una catena laterale, che si uniscono centralmente con dei legami ad H. (v. fig. 14).

Sono state stabilite le distanze fra i vari componenti e sono note le misure dei singoli segmenti.

La maggior polimerizzazione vuol dire quindi maggior lunghezza delle fibre,
vuol dire diversa «spazialità» volumetrica,

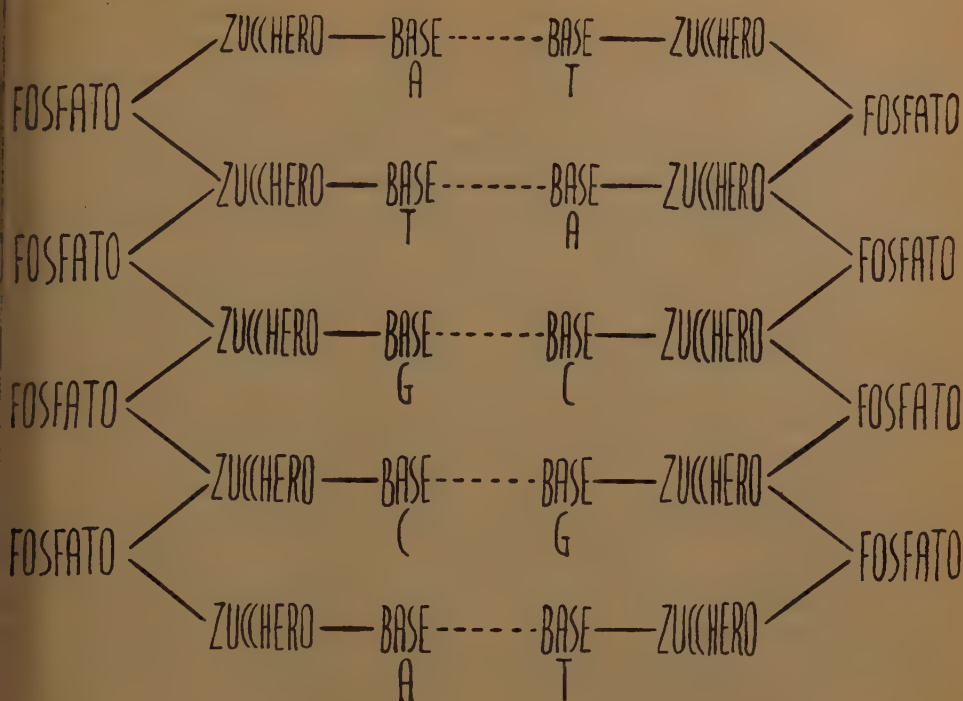


Fig. 14. — Schema di una molecola di ADN dimostrante le due catene « zucchero-fosfato » e l'appaiamento delle basi. Le linee punteggiate corrispondono a dei legami di idrogeno (da WATSON e CRICK, in DE GROUCHY 1958, p. 28).

vuol dire più o meno gruppi polari acidi nella catena fosforica, utilizzabili con vari possibili legami quantitativi e qualitativi, — non solo ionici ma anche di covalenza —, specie con le proteine formanti i geni — istoni e nucleostoni,

vuol dire variazioni di rapporti con quella grossa frazione di proteina non-istonica (il 65% delle sostanze chimiche del nucleo), a cui si riconosce una funzione speciale metabolica nel nucleo e che noi radiobiologi dobbiamo considerare per una possibile azione «indiretta» sulla cromatina nucleare, specie se si consideri la matrix, cioè il liquido che circonda la spirale del cromonema.

Ma per quello che qui interessa, ha una grande importanza la *disposizione e la quantità dell'ADN* nel cromosoma e nel cromatide, le unità istio-anatomiche, di cui riscontriamo la «rottura».

Già il Riss fin dal 1952 aveva suggerito l'idea che il cromosoma fosse costituito da unità submicroscopiche elementari, più specialmente microfibrille a spirale: il che ha dato un'impulso all'ipotesi di WATSON e CRICK sulla costituzione della fibrilla dell'ADN e alla constatazione che la cromatina si raccoglie nel cromonema, formazione elicoidale, con chiara evidenza di due spirali — una maggiore ed una minore —, a vari giri, più o meno numerosi, secondo il periodo del processo mitotico.

In altre parole il cromonema e la disposizione della cromatina variano nel nucleo di una cellula in rapporto al rispettivo periodo del processo mitotico.

1) Per la *disposizione*: come materiale di studio, hanno soprattutto servito i cromosomi giganti o politeni delle cellule poliploidi delle ghiandole salivari dei ditteri. In questi cromosomi appare un susseguirsi di bande o dischi colorati (« bands »), perché contenenti i cromomeri ricchi di ADN, alternati a zone chiare o poco colorate (« interbands »). Feulgen negative, poco assorbenti l'U.V., perché contengono sostanze proteiche.

Queste bande di ADN, sono fisse e costanti come numero nelle singole specie, — tanto da permetterne il riconoscimento —, il che va messo logicamente in rapporto anche con il caratteristico e ben definito numero dei cromosomi di ogni singola specie; corrispondono soprattutto a quella frazione chiamata *eucromatina*, tanto importante per i suoi intimi rapporti con i geni — in prevalenza istoni —, fissa e costante (CASPERSSON, 1950), che si produrrebbe solo nella mitosi (FURST e coll. 1951) e si tiene separata dall'altra frazione *eterocromatina*: non tanto per la colorabilità, — quantitativamente diversa, anzi opposta in qualche fase della mitosi e del nucleo a riposo, dove i cromomeri si considerano di eterocromatina —, quanto perché questa è ritenuta geneticamente inerte, con differenti proprietà chimiche e fisiche (v. per es. CHARGAFF e coll. 1955), ma capace di partecipare attivamente al metabolismo degli acidi nucleici con un importante ruolo nel controllo dello sviluppo ed ha rapporti solo con proteine complessate coagulabili.

Su tali basi CASPERSSON, a conclusione dei suoi ben noti studi, costruì le cosiddette « carte topografiche » degli acidi nucleici ed oggi si ammette che anche il nucleo a riposo presenti una simile disposizione — malgrado che istologicamente non si riesca a darne la dimostrazione — e su tali schemi sono ricalcate le « mappe genetiche ».

2) Per la *quantità*: l'ADN aumenta nell'interfase e nella profase, che come due terzi del processo occupano ben i 2/3 di tutto il ciclo cariocinetico: l'inizio di questo aumento, secondo alcuni AA., avrebbe luogo dai cromomeri, alias eterocromatina del nucleo in riposo o tipico ADN, caratteristico della specie in studio, e raggiunge il suo massimo, cioè il raddoppio, all'inizio della metafase.

L'istologia classica ci aveva dimostrato tutto questo con la maggiore evidenza della cromatina nucleare — il noto spirema —, la comparsa e la condensazione dei cromosomi fino alla formazione della placca equatoriale, la migrazione e la scomparsa del nucleolo; ma oggi si sa che questo raddoppio si accompagna anche ad una notevole diminuzione delle sostanze proteiche nucleari, alla scomparsa della membrana nucleare ed a notevole

modificazioni fisico-chimiche del citoplasma (aumento di tensione superficiale e viscosità per favorire la cinetica dei cromosomi).

Il raddoppio dell'ADN trova nello schema di Watson e Crick un'interessante ipotesi, che ben si inquadra nelle odierne cognizioni in campo di citologia nucleare: infatti detti AA. ammettono che la doppia spirale della molecola dell'ADN si rompa, «svolgendosi», a livello dei legami ad H fra le basi pirinica e pirimidinica ed ogni singola catena si raddoppi secondo il rigido schema della base omologa corrispondente, rimanendo inalterata la duplice sequenza delle basi, dando luogo a due doppie catene molecolari figlie, perfettamente uguali alla primitiva doppia catena molecolare madre. Così quel «caratteristico», «tipico» ADN di quella specie — anche dal punto di vista genetico e dell'ereditarietà — rimane fisso e costante, atto a sostenere i nuovi geni di raddoppio, a costituzione prefissata, che debbono comparire e sistemarsi adeguatamente, trovando già pronto il loro necessario ed indispensabile supporto.

Dalla duplicatura della molecola di ADN è facile risalire secondo questo schema a spiegarci il raddoppio dei cromosomi nella mitosi, ben tenendo presente che la «*spirale*» è la forma geometrica fondamentale e comune a tutte le formazioni microscopiche e sub-microscopiche del cromosoma.

Così quel dato ADN caratteristico per quella singola specie zoologica è quantitativamente costante ed in rapporto diretto al cariotipo (caratteri dei cromosomi) e qualitativamente ben definito — probabile costante numero di microfibrille, vario e fisso grado di polimerizzazione, uguale sequenza di coppie di basi «conseguenziali» nelle due catene a spirale, ugual numero di «bande» scure —: quindi *vero e proprio materiale genico*, come ci fanno intravedere i fenomeni di trasformazione e di trasduzione descritti nei batteri da LEDERBERG e coll. (1953-1956).

Perciò è logico trovare «rotture» dei cromosomi e dei cromatidi, soprattutto nei primi 2/3 del processo mitotico — cioè interfase, profase ed in parte metafase —, perchè «*volumetricamente e spazialmente*» i cromosomi e i cromatidi offrono un bersaglio adeguato alle particelle ionizzanti: senza tacere la loro «radiosensibilità» tutta particolare in rapporto al processo biologico che si va svolgendo. Ed una precisazione più «fochettata» porta logicamente a localizzare la «rottura», come grave danno «locale e localistico», all'ADN raggruppato in una «banda» oscura o ben colorata. Quale numero di molecole del polimero ne risulti danneggiato è arduo rendersene conto: merita in ogni modo un accenno particolare quel successivo ben documentato aumento di viscosità, voluta espressione di una depolimerizzazione «locale» dell'ADN, il che presuppone la rottura di vari legami chimici nella macromolecola o nella catena del polimero.

Questa aumentata viscosità sarebbe la base chimico-fisica che ci rende ragione

delle successive aberrazioni ed arrangiamenti dei cromosomi — l'inversione o saldamento di un frammento ad un cromosoma interrotto, l'intercambio o ricostruzione di cromosomi interrotti con scambio reciproco di segmenti cromosomici e la deficienza o figurazione anomala per mancato saldamento: fenomeni classificabili come «secondari» e condizionati dalla cinematica dei frammenti cromosomici o cromatidici nelle susseguenti fasi della mitosi.

Naturalmente la «rottura» di un cromosoma e più particolarmente di un disco «scuro» porta di conseguenza anche una possibile *alterazione distruttiva o lesiva dei geni*, che con l'ADN hanno rapporti di vario genere e natura.

Infatti i geni sono intesi come macromolecole, le cosiddette ADN-proteine, nelle quali le proteine sono in prevalenza, ma non esclusivamente, a tipo di istone: sulla cui struttura il BLOCH (1955), riprendendo il ricordato modello dell'ADN di WATSON e CRICK, ha prospettato l'ipotesi che le proteine, come catena polipeptidica, si avvolgano attorno alla doppia elica dell'ADN, sì che le catene laterali degli aminoacidi possano formare dei legami ionici con i gruppi fosfatici delle due catene polinucleotidiche. Il che ben si addice agli odierni concetti secondo i quali l'ADN sarebbe caratteristico per la specie, mentre le ADN-proteine lo sarebbero per il tipo cellulare e che l'ADN rappresenterebbe la porzione funzionale del cromosoma, immerso in un involucro di dette proteine.

Ma i geni possono anche essere lesi «isolatamente», perchè le particelle ionizzanti senza arrivare alla «rottura» del cromosoma, sono capaci anche di indurre *lesioni limitate di un «locus» di un cromosoma*, modificandone «localmente» la struttura: il che implica, anzi esige, una «localizzazione» più minuta e particolare, che lo schema del BLOCH fa intuire.

Tali alterazioni, che avverrebbero di preferenza verso la fine del periodo intercinetico, oggi non sono istologicamente rilevabili, ma si manifestano nella discendenza, nell'ambito delle modificazioni fenotipiche, sia come mutazioni, sia come manifestazioni morbose: se il gene colpito è dominante, nella prima generazione, se recessivo, nelle successive, ma solo in seguito alla casuale ma geneticamente idonea unione di due eterozigoti. Altrimenti il gene recessivo non ha modo di manifestarsi, rimanendo così latente nei singoli individui portatori e si ammettono vari i geni alterati o disvitali, che rimangono nascosti negli eterozigoti. Sono concetti che derivano dalla radiogenetica.

Rispetto alla divisione ben netta delle fasi della mitosi, accennare ad un «periodo intercinetico» per la maggiore possibilità di lesioni ai geni, (v. per es. CIARANFI 1955-1957) vuol dire indicare un periodo non

con la dovuta precisione ma solo con una certa approssimazione: sembrerebbe tuttavia un periodo lontano o fuori della mitosi, il che è importante anche dal punto di vista radiobiologico, perchè «...il problema della... duplicazione... dei geni, che costituiscono il cromosoma, ha fatto piccoli progressi» (v. DE ROBERTIS 1955), rispetto per es. alle odierne cognizioni sull'ADN.

In ogni modo c'è differenza fra contenuto genico di cellule germinali e contenuto genico di cellule somatiche: sembra certo un cielo nel metabolismo proteico nucleare, specie durante la mitosi, con aumento degli istoni da prima nella pro — e nella metafase (autoduplicatura dei geni?) e poi con la comparsa di vari aminoacidi — importanti le basi exoniche, costituenti la cosiddetta «ossatura» delle catene polipeptidiche delle nuove proteine di sintesi, la frazione non-istoni etc.

Oggi poi si parla di «fine organizzazione del materiale ereditario» e sappiamo per esperienza quanto importanti siano i contributi della genetica per tutte le questioni che riguardano l'istologia, la citologia ed infine la radiogenetica e la radiobiologia.

Così debbo accennare al cosiddetto pseudoallelismo, per cui alleli multipli, apparentemente dipendenti da un solo «locus», sono risultati separabili e separati con un chiaro crossing-over, dimostrando così di essere dipendenti da «loci» differenti e più piccoli e soprattutto con diverse «relazioni spaziali» — esempio classico, la famosa serie «bianca» della drosophila (v. per es. GLASS 1955): e debbo ricordare i lavori del BENZER (1955-1957), che nei fagi ha potuto ridurre ad una struttura lineare il gene ed il suo sottomultiplo — cistrone od unità di funzione, calcolato come lunghezza pari a qualche centinaio di nucleotidi — e nel cistrone ha potuto ancora differenziare all'estremo limite del potere di risoluzione le minime unità, capaci di mutare o di ricombinarsi — il muton ed il recon, pari come lunghezza ad un paio di nucleotidi — cioè «dissecando» il gene, unità non più unica ed indivisibile, ma composto di unità più semplici, indipendenti geneticamente e proponendo infine delle carte «cromosomiche», molto più dettagliate delle note, in cui le mutazioni lungo il cromosoma si fanno corrispondere a «zone» di varia lunghezza — da più centinaia di paia di nucleotidi a qualche paio di nucleotidi — separate da spazi chiari, sia pure non del tutto regolarmente disposte.

Così lo studio delle mutazioni secondo questi concetti ed in riferimento ai *geni* considerati *volumetricamente*, potrebbe darci indirettamente dei dati e sulla «localizzazione» dei *microeventi* e sulle *dimensioni* di un «locus», inteso come «zona d'azione», seguendo lo stesso ragionamento usato per definire per es. sia le relazioni fra radiazioni e distanze cristalline, sia la stima di una «zona d'urto».

Pur tenendo presente che un «locus» può essere compreso in una

«zona d'azione» e non rappresentare «tutta» la «zona d'azione», il concetto «spaziale e zonale» si applica logicamente e risponde con molta verosimiglianza a questo modo di interpretare in generale l'azione delle particelle ionizzanti e dell'energia radiante, tenendo presente che in via di massima un «locus» è tanto più facilmente lesionabile in rapporto diretto alle sue maggiori dimensioni «spaziali» ed al maggior flusso delle particelle ionizzanti.

Per le stesse ragioni il fattore «volume» si impone per es. come rapporto fra grandezza del nucleo e grandezza del citoplasma — il cosiddetto «indice nucleoplasmatico» dell'HERTWIG: nel senso che ci sia maggior probabilità di lesioni nell'uno o nell'altro, in rapporto diretto alla loro maggiore e relativa grandezza; perciò nulla da obiettare se *un citoplasma relativamente più esteso rispetto al nucleo possa in definitiva dimostrarsi più lesio.*

Già nel 1933 e nel 1937 avevo dimostrato (CASATI e CAFISSI) una maggiore ed iniziale radiolesività del citoplasma rispetto al nucleo — e più particolarmente dell'endoplasma in sede paranucleare (ergastoplasma?), spiegandolo soprattutto con ragioni «radiobiologiche» — e questo allora contraddiceva con l'accettata maggiore, se non esclusiva radiosensibilità nucleare, da tutti ammessa: DURYEE (1939) mi ha però sperimentalmente confermato col trasportare nuclei sani non irradiati in citoplasmi di uova irradiate e notando poi alterazioni nucleari.

Ma oggi con le odierne cognizioni, si può precisare ancor meglio e scendere a particolari più dettagliati, e pongo senz'altro la questione della «radiobiologia del citoplasma».

Convieni ricordare come dagli studi elettromicroscopici nel citoplasma noi possiamo dimostrare e studiare (fig. 15):

1) l'apparato mitocondriale nei suoi componenti granulari (mitocondri), a bacchetta (condrioconti) e microsomi — a doppia membrana esterna e all'interno provvisti di doppie creste, un modello fondamentale nella scala zoologica, che ricorda la struttura lamellare dei cloroplasti (GRANICK e PORTER 1947),

2) l'ergastoplasma in sede paranucleare con i suoi filamenti delimitanti canali — o semplici, contenenti le «unità glicogeno» (porzione agranulare del PORTER 1959) o con densi granuli, contenenti dell'ARN in notevole quantità (porzione granulare del PORTER),

3) l'apparato del Golgi nei suoi vari aspetti,

4) l'apparato centrosomico,

5) la presenza di una struttura fibrillare proteica submicroscopica del citoplasma e di micelle allungate, che condizionano lo stato di sol o di gel.



Fig. 15. — Diagramma di una cellula animale: A, apparato del Golgi: B, centriolo: C, nucleolo: E, cromonema: F, cariosoma o falso nucleolo: G, membrana cellulare (pellicola): H, membrana del plasma: I, citoplasma corticale: J, plastidi: K, condriosomi: L, vacuolo: M, inclusioni cellulari (gocce di grasso etc.) (da WILSON, in DE ROBERTIS 1955, p. 66).

Inoltre l'odierno concetto della *stretta corrispondenza fra struttura e funzione* qui può trovare piena conferma, in rapporto anche alle caratteristiche dell'azione radiobiologica che ricorderemo ancora.

Infatti alcuni AA. sostengono che la struttura di una cellula, sotto un certo punto di vista, andrebbe intesa come disposizione spaziale degli enzimi, che lungi dall'essere liberi ed isolati si ritrovano riuniti in vere e proprie unità multienzimatiche, oggi istologicamente dimostrabili, come per es. i mitocondri, sotto questo riguardo i più conosciuti, tanto che il BOURNE (1950) arriva a rappresentare un condriocoito come un voido, in cui localizza in un polo gli enzimi del ciclo di KREBS, tanto importanti soprattutto per il metabolismo dell'acido piruvico, complessivamente di confluenza per glicidi, lipidi e proteine, e nell'altro polo un sistema di citocromo-ossidasi (i citocromi del KEILIN ed il fermento

respiratorio del WARBURG) per la ossidazione finale aerobica dei metaboliti.

In sintesi perchè una cellula espliciti le sue funzioni metaboliche è indispensabile che la sua struttura sia integra e viceversa un'alterazione funzionale, in uno qualsiasi dei suoi ingranaggi, compromette la struttura di una cellula.

Un danno radiobiologico iniziale può dunque ammettersi come alterazione delle ultrastrutture o come alterazione chimica di un enzima di un dato sistema, che interrompa il normale ciclo metabolico: ma più probabilmente per quello che qui si sostiene, una « zona d'azione » può alterare « localisticamente » parte delle une e parte delle altre, insieme e contemporaneamente, per gli intimi rapporti fra ultrastrutture citoplasmatiche ed enzimi.

È questa una caratteristica dell'« azione radiobiologica » rispetto alle varie noxe della patologia cellulare, le classiche indirizzate allo studio soprattutto delle lesioni morfologiche con i metodi tradizionali non ben definiti dal punto di vista biochimico, le più recenti che tentano di provocare lesioni metaboliche particolari attraverso un meccanismo lesivo di ordine biochimico prescelto e quindi ben definito.

Conferma in parte di quanto sopra, ricordo alcuni recenti lavori.

Il primo è quello di POZZA, RUZZATO e VERGA (1959a). Questi AA. hanno osservato che in cellule epatiche di ratto, a dosi piccole e frazionate, le lesioni all'inizio si rilevano nel citoplasma e più particolarmente nel reticolo endoplasmatico, o ergastoplasma, con la presenza in qualche punto di un certo diradamento delle maglie, mentre i mitocondri ed i nuclei appaiono indenni. In proseguo di tempo e a dosi più forti, il diradamento si rileva più spiccato fino a raggiungere la soluzione di continuo, la formazione di vacuoli e l'edema cellulare e solo allora i mitocondri dimostrano rigonfiamento con disordini strutturali delle creste interne ed i nuclei presentano una tendenza alla picnosi e al raggrinzimento della membrana.

Questo lavoro è innanzitutto una conferma su base elettromicroscopica di quanto ho già sostenuto e cioè:

1° che le lesioni iniziali, nel vero senso della parola, sono localizzate e con il tipico aspetto di « zone d'azione »;

2° che si trovano da prima nel citoplasma e più precisamente nell'ergastoplasma, mentre il nucleo ed i mitocondri appaiono indenni. Perciò dal punto di vista radiobiologico l'ergastoplasma può considerarsi più radiosensibile e perciò più lesionabile del nucleo e dei mitocondri: il che, portato sul piano morfologico-funzionale, vuol dire anche

interazioni iniziali e più gravi nelle sintesi delle proteine citoplasmatiche con tutte le conseguenze di ordine biofisiologico ben deducibili.

La questione merita un breve commento, perchè la sintesi delle proteine citoplasmatiche è intimamente collegata alla grossa questione degli acidi nucleici e più specialmente dell'ARN — l'acido nucleico del nucleolo e del citoplasma —, i cui grossi grani sono specialmente evidenti e numerosi nell'ergastoplasma.

È bene dire subito che dell'ARN si conosce solo la composizione chimica — rispetto all'ADN la timina è sostituita dall'uracile (che ne differisce per la mancanza del gruppo CH_3 in posizione C-5) e al desossiribosio si sostituisce il ribosio, vero e proprio zucchero perchè in posizione C-2 ha un gruppo alcolico secondario CHOH , invece del CH_2 — ma non si conosce la sua struttura molecolare: la successione delle basi non sembra regolare come nell'ADN: vario può essere il suo grado di polimerizzazione — in ogni caso molto minore di quello dell'ADN — e non pochi AA. parlano di APN, cioè di acido pentosionucleinico (v. per es. ZINGONI 1956) o meglio di acidi pentosionucleinici.

L'ARN si fa derivare dall'ADN nucleare secondo l'accettata ipotesi del CASPERSSON e si precisa dall'eterocromatina, la parte cioè non legata ai geni — e la sua sintesi avverrebbe nel nucleolo: di qui attraverso la membrana nucleare passerebbe nel citoplasma, pur subendo un certo grado di depolimerizzazione (ZINGONI 1951): quindi una gran parte di ARN citoplasmatico, proveniente dal nucleolo, è di origine nucleare, anzi è attraverso l'ARN che l'ADN « trasmette l'informazione genica » — una delle caratteristiche fondamentali del « materiale genico ».

È ben noto che il citoplasma di ogni cellula è caratterizzata dalle sue varie proteine e da quelle molecole protidiche specifiche, che sono gli enzimi, intesi come regolatori del metabolismo di tutto il materiale di « costruzione » cellulare. Oltre le dottrine del « codice » e dello « stampato », secondo le quali esiste una relazione parallela e diretta fra la molecola dell'ADN e la molecola di proteina — ciascun frammento della prima influenza direttamente la sintesi di un preciso frammento della seconda (v. per es. SCHWARZ 1955) —, esiste anche la teoria, che ammette un intermediario fra l'ADN e la proteina e cioè l'ARN, che, capace di trasmettere l'« informazione genica » dell'ADN, è direttamente responsabile o della sintesi delle molecole protidiche specifiche (enzimi) e delle proteine citoplasmatiche oppure delle sole sintesi proteiche propriamente dette (v. per es. GALE 1956).

Ed ecco l'importanza dell'eterocromatina nucleare, dell'ARN e dell'ergastoplasma, in quanto ne contiene come uno degli organuli più importanti delle sintesi proteiche — in ogni organulo sono i microsomi, che ne contengono il 50/100 del loro peso molecolare (v. per es. LADE 1956).

Queste osservazioni costituiscono una buona base per la necessità di considerare nei nostri studi una radiobiologia del citoplasma.

Ed infine:

3° che le lesioni « localistiche » appaiono in breve volger di tempo anche *negli altri organuli*.

E qui va sottolineato che la *membrana nucleare* con i suoi due strati, uno continuo ed uno con pori, ha dunque rivelato la possibilità di lesioni precoci, con conseguente compromissione delle sue funzioni, fra le quali vanno ricordate quella di isolare il nucleo dal citoplasma e quella di regolare il flusso dei metaboliti endocellulari partecipando al metabolismo nucleare.

Non andrebbero dimenticate anche eventuali lesioni della *membrana cellulare*, caratterizzata dal suo strato lipidico e dal suo strato proteico, che, se integra, mantiene la cellula libera ed indipendente dall'ambiente nel quale si trova, grazie al suo potere di regolare la permeabilità cellulare, con tutti gli scambi a questa connessi, sui quali definitivamente si basa la normalità di condizioni fisiologiche intracellulari soddisfacenti.

È prevedibile che le nostre cognizioni in un prossimo futuro saranno più ampie e dettagliate, sia in rapporto alla qualità e quantità delle lesioni, sia in rapporto al loro progredire fino a raggiungere ben note e più estese alterazioni cellulari, come rilevabili al microscopio ottico: posso dire fin d'ora *tanto più facilmente, quanto più numerose e relativamente più grandi siano queste « zone d'azione » iniziate specie se contemporanee, e se colpiscano più o tutti i vari organuli, onde anche una consensuale maggiore o minore distruzione di enzimi, il che può considerarsi il meccanismo d'azione più frequente da parte dell'energia radiante.*

Come conferma a quanto sopra ricordo il lavoro di RUBIN e MIKHEEVA (1958), i quali mentre nella polpa dei tuberi di patata trovano immutato il numero dei mitocondri, il contenuto dei fosfolipidi ed acidi nucleici e l'attività dei fermenti, negli « occhielli » invece trovano reperti del tutto opposti, cioè modificazione del complesso proteico-lipidico nucleico dei mitocondri e diminuzione dell'attività dei fermenti ossidanti, quindi concludono che le modificazioni dell'attività dei fermenti ossidanti sono correlate con la distruzione dell'integrità strutturale e della composizione chimica dei mitocondri: riferendo cioè classiche esperienze e vecchi concetti del WARBURG (1912) sui processi respiratori, intesi come « legati all'impalcatura e alle *strutturazioni* della cellula » — noti il termine « *strutturazione* » molto più completo che « *struttura* ».

Degno di nota anche un lavoro di POZZA, RUFFATO e VERZA (1959b), a complemento del precedente: gli AA. hanno voluto determinare con omogenati di fegato di ratti, trattati alle massime dosi usate, quando le lesioni cellulari si erano dimostrate più evidenti, l'attività succinodidrogenasi, cioè l'attività di un enzima appartenente al gruppo degli enzimi sulfidrilici e a sede mitocondriale, riscontrandone un lieve aumento, probab-

ente « in rapporto al maggior contatto dell'enzima col substrato ossidabile per alterazione degli equilibri osmotici, propri delle strutture cellulari interessate dal danno radiante ».

Il che oggi con le odierne ricerche di ordine biochimico, correlate e confrontate con quadri istopatologici e criticamente interpretate su un piano morfologico-funzionale fatti locali e di ordine generale, non deve meravigliare, perchè è stato dimostrato che cellule sicuramente lese alcune funzioni possono « paradossalmente » dimostrarsi aumentate invece che « logicamente » diminuite: come per es. il maggior consumo di ossigeno da parte di sezioni sopravvivenenti di fegato steatosico da sostanze tossiche rispetto a sezioni sopravvivenenti di fegato normale (v. per es. MEIER e THOENES in CIARANFI 1957) e l'aumento di sintesi proteiche nel rigonfiamento torbido (CIARANFI, FONSESUS GUIDOTTI, in CIARANFI 1957).

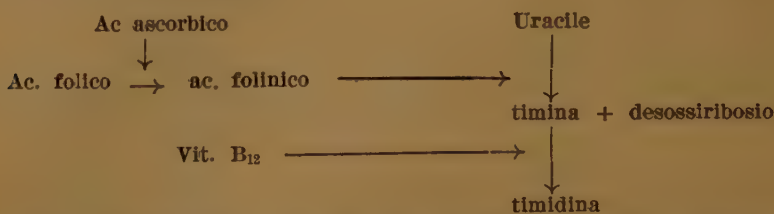
Ora se in radiobiologia è da prevedersi una descrizione di alterazioni ultramicroscopiche iniziali, forse in maggior copia che con altri sistemi di ricerca, biochimici compresi, non si può pretendere di arrivare a precise interpretazioni su *eventuali lesioni enzimatiche*. Alcune possono essere senz'altro ammesse, tenendo presente per es. che una grave alterazione dell'apparato mitocondriale vuol dire lesioni plurienzimatiche gravi e molteplici — enzimi respiratori, enzimi della polimerizzazione degli acidi grassi superiori, dell'accoppiamento della fosforilazione con le ossidazioni, del ciclo di KREBS etc. Per il resto non si può avanzare che delle ipotesi con le dovute riserve come sarebbe per es. il tentativo di spiegare su questa base *i caratteristici effetti dell'irradiazione sugli acidi nucleici*.

È ben noto infatti che dopo irradiazione mentre nel nucleo si ha una diminuzione della sintesi dell'ADN, nel citoplasma invece si ha un accumulo di ARN (EULER ed EVESY 1944): il che vuol dire che solo l'ADN e la sua sintesi risentono dell'irradiazione, mentre al contrario ne restano indenni l'ARN e la sua sintesi.

Radiobiologicamente una *maggiore radiosensibilità* — nel senso più volte da me specificato (1928) — dell'ADN rispetto all'ARN — anche senza entrare in merito alla questione con più fini precisazioni — potrebbe spiegare la diversità degli effetti sugli acidi presenti, ma non sulle loro sintesi — alterata per l'uno, inalterata per l'altro. Il danno complessivo presumibile dovrebbe allora ricercarsi nei processi che portano alla complessa costituzione dell'ADN.

E qui vanno ricordati gli studi di VILTER e coll. (1950) circa il ruolo di alcune vitamine — la B₁₂, l'acido folinico e l'acido ascorbico — per la formazione dell'ADN nell'eritroblasto in via di maturazione normoblastica. Infatti secondo detti AA. la B₁₂ acce-

lera come enzima l'unione della timina con il desossiribosio, formando così uno dei quattro nucleosidi fondamentali dell'ADN — la timidina —, processo che manca nella formazione dell'ARN. Se questo processo per un effetto inibitorio sulla B_{12} viene bloccato, la formazione dell'ADN viene impedita.



Inoltre all'inattivazione della B_{12} può accompagnarsi quella dell'acido ascorbico, attivatore del passaggio dell'acido folico in acido folinico (*citrovorum factor*), che a sua volta attivatore della metilazione dell'uracile, che si trasforma così in timina. Il tutto vuol dire anche possibilità di bloccaggio di una trasformazione chimica basillare: un'eventuale formazione dell'ADN dall'ARN.

Naturalmente questa ipotesi esplicativa, ammessa oggi per gli eucarioti, *va estesa ad ogni altra cellula*, per quanto riguarda la formazione degli acidi nucleici; e l'azione enzimatica viene considerata nel suo schematismo più semplice e semplificato, perchè oggi si ammettono sistemi plurienzimatici, armonicamente funzionanti, anche con possibili interazioni di rinforzo o di antagonismo; si distinguono degli enzimi di costituzione, presenti anche in assenza di substrato e degli enzimi di adattamento, prodotti solo dalla presenza di substrato specifici (MONOD 1952) e si è dimostrato che un metabolita inibisce ad una certa concentrazione l'azione di un sistema enzimatico (STRAUSS 1955).

Infine non va dimenticato che un'alterazione di un enzima può essere riferita anche ad un'alterazione di un gene, secondo quanto dimostrò il BEADLE (1951), sostenitore dell'ipotesi che ogni reazione biochimica del metabolismo è controllata da un gene, responsabile della precisa struttura dell'enzima, catalizzatore di un determinato passo metabolico: onde, *un gene = un enzima*.

Quindi in campo di ipotesi esplicative una lesione parziale di un cromosoma per una minima «zona d'azione» può portare in prospettiva di tempo secondo questo meccanismo radiobiologico, ad un'alterazione citoplasmatica morfologico-funzionale, come in una cellula germinale porta ad una malformazione o ad un processo morboso.

Poichè vasto è il campo delle nozioni e delle ipotesi per quanto riguarda gli enzimi, le riserve su probabili interpretazioni in senso morfologico-funzionale non saranno mai di troppo.

In base a queste considerazioni è facile intendere come infine il danno da energia radiante», localizzabile in varie «zone d'azione» e varia sede, in più organuli, con i diversi meccanismi radiobiologici accennati, possa estendersi *a tutta o a gran parte del citoplasma*, risultandone gravi lesioni, ben rilevabili al microscopio ottico.

Il che radiobiologicamente meglio ancora si spiega, tenendo presente che il citoplasma presenta anche una continua ed ininterrotta *circolazione citoplasmatica o ciclosi*, sulla quale occorre dare un cenno.

Ben dimostrabile e studiata nelle cellule vegetali, è presente anche nelle cellule animali e dal punto di vista fisiologico e funzionale è quanto mai importante per ragioni ben intuibili.

Sembra acquisito che sotto stimoli chimici, fisici, luminosi, calorifici subisca delle variazioni in più o in meno, fino a cessare del tutto al di là di certi limiti: non è fuori luogo avanzare l'ipotesi che *anche l'energia radiante vi apporti delle modificazioni*: notevole il fatto che l'aumento di viscosità la faccia diminuire, quindi gli stati reversibili di sol-gel sono quanto mai importanti a questo riguardo.

La corrente citoplasmatica non comporta variazioni di forma nella cellula stessa.

Questa *circolazione citoplasmatica* acquista appunto tutta una sua particolare importanza *in radiobiologia* in rapporto alle ben note *azioni chimiche secondarie* (CASATI 1928, 1951 a, b) o azione indiretta, in quanto una sostanza comunque nociva — come per es. un iperossido —, formandosi in una qualunque «zona d'azione» nel citoplasma, se non venga subito neutralizzata in situ, si può ammettere trasportata più oltre da questa corrente con i relativi danni «a distanza».

Meccanismo d'azione da tempo riconosciuto e ben noto, per cui è sufficiente solo questo accenno.

Inoltre dal punto di vista radiobiologico non si può sottovalutare la circostanza che la *composizione chimica del citoplasma* è diversa nelle varie cellule ed in una stessa cellula è ben lontana dall'essere uguale e costante nei suoi vari periodi funzionali. Per quello che ho già accennato più sopra circa la *radiosensibilità delle varie sostanze irradiate* vanno considerate anche le cosiddette *sostanze incluse*, importanti soprattutto le gocce di grasso, il glucosio, variamente disposto secondo le diverse specie cellulari — omogeneamente o ad ammassi — e le stesse *secrezioni specifiche* delle cellule.

Alcune alterazioni istologiche possono avere come substrato l'*alterazione o la scomparsa di queste*, non di rado per la concomitante azione di fissativi, come già dimostrai per le cellule epatiche e renali in ricerche di radiotematologia (CASATI e CAFISSI 1935 e seguenti).

Da quanto detto è intuibile come in seguito all'instaurarsi di una grave alterazione citoplasmatica da energia radiante, possono seguirne facilmente *la morte o la necrosi della cellula*: oppure *lesioni più o meno gravi, in dipendenza del numero, dell'accumulo, della contemporaneità di varie «zone d'azione»*, ma reversibili con ripresa della mitosi e della ricostruzione del citoplasma, quando siano state allontanate le sostanze comunque nocive od inibenti i vari processi normali, prodotti durante ed a causa dell'irradiazione.

Fra questi processi riparativi ho anche ammesso la possibilità, e tali possono essere considerati dei processi di «sifferenziazione» per aver interpretato come elementi «sifferenziati» alcune speciali cellule descritte nel midollo osseo irradiato (CASATI 1929b e seguenti).

Questi processi di *riparazione* sono da considerarsi come «secondari» e «reattivi», che seguono all'azione dannosa vera e propria dell'energia radiante e sono molto influenzati dai cosiddetti «fattori biologici», sui quali fin dal 1930 ho richiamato l'attenzione su basi sperimentali (CASATI): ma non rientrano nella trattazione del presente testo e basta perciò questo semplice accenno.

Infine debbo ricordare, come osservazione finale e conclusiva, che per l'accumularsi ed il confluire di più «zone d'azione» di ordine «cellulare», nel senso più sopra precisato, si possono formare *quelle «zone d'azione» di più facile rilievo microscopico* ed evidenziabili con gli ingrandimenti più piccoli, dove si trovano raggruppate più cellule istologicamente lese ed in maggior numero rispetto agli altri campi microscopici: che mi hanno appunto servito come osservazione preliminare come rilievo fondamentale per la formulazione della mia teoria sulla «zona d'azione», che oggi riconfermo e completo con questo lavoro sulla base della recente letteratura radiologica.

Riassumendo, anche nel campo istologico, studiato al microscopio ottico ed ancor più al microscopio elettronico, si trovano chiari esempi di lesioni ad organuli, a cellule e a gruppi di cellule, localizzate in «zone», alle quali si possono bene applicare i concetti generali, che informano la teoria della «zona d'azione». Dalle rotture dei cromosomi — quali lesioni più frequenti e più studiate —, alle alterazioni degli organuli — che ora cominciano ad essere descritte — e alle lesioni del citoplasma — sulle quali ho particolarmente insistito per proporre, come oggetto di studio interessante, la *radiobiologia del citoplasma* —, si può sempre dimostrare che le lesioni sono riscontrabili in «zone» nel senso predetto.

Già alcuni AA. hanno accennato ai «microeventi» che le producono, ma qui si definiscono in termini chiari ed inequivocabili e si considerano direttamente come cause determinanti, nel vario giuoco degli influssi energetici.

Lo studio morfologico-funzionale, che oggi — e ben a ragione — informa la fisiologia e la patologia cellulare, con i sussidi della tecnica più progredita applicata in campo istologico e i vari contributi della radiogenetica sperimentale e dell'enzimologia possono essere di grande utilità per risalire alle più fini localizzazioni «zonali» delle lesioni iniziali e delle lesioni francamente dimostrabili in proseguo di tempo: ma nello stesso tempo contribuiscono a rendere ancor più complessa e difficile la spiegazione dell'intimo meccanismo d'azione delle manifestazioni radiobiologiche.

Naturalmente sono necessari anche i richiami alla chimica organica, alla biochimica e alla strutturistica dei vari componenti chimici della cellula per tener presente la loro specifica «radiosensibilità» nel senso più volte specificato, che è in ultima analisi alla base di ogni effetto da energia radiante (CASATI).

CONCLUSIONI E RIASSUNTO

Dalla revisione critica della recente letteratura radiologica, il concetto teorico della «zona d'azione» trova ulteriori conferme nel campo fisico, energetico, chimico ed istologico, perchè ben chiara si afferma la necessità, da parte di tutti gli AA., di stabilire la «distribuzione» e la «localizzazione spaziale» sia dei microeventi, sia dell'energia in gioco, sia dei prodotti chimici formati.

Così la «traiettoria» delle particelle ionizzanti acquista tutta una sua particolare importanza come «sede» degli eventi fisici primari, l'insieme di tutte le traiettorie secondo ZIRKLE corrisponde al «volume totale delle traiettorie», gli eventi secondari sono presi in considerazione per gli effetti che «localmente» ne derivano, le ionizzazioni si localizzano sulla traiettoria delle particelle primarie e le eccitazioni all'intorno.

Lo stesso concetto del TEL considera l'energia dissipata in tutte le traiettorie delle varie particelle e ne studia la distribuzione per «unità di lunghezza», arrivando così alla determinazione «localistica e spaziale» dell'energia ceduta, spesa per produrre sia ionizzazioni che eccitazioni. Nel TEL si fa anche accenno ad un possibile meccanismo di

«sommazione energetica» — completa ed incompleta — per gli effetti osservati.

Nel campo chimico è stata studiata lungo le traiettorie la distribuzione degli ioni positivi — al centro — ed ioni negativi — alla periferia —, dei radicali, degli atomi e delle molecole eccitate, onde rendere conto delle possibili reazioni chimiche, che ne possono seguire — reazioni radicali o molecolari, reazioni competitive, azioni chimiche secondarie. Le denominazioni «répartition locale des ions», «spur», «grappe», «hot spots», «cage», «little region» — che indicano tutte una «zona» —, vogliono chiaramente indicare una «localizzazione» di vari prodotti: il che si addice anche perfettamente al concetto fondamentale di considerare la «zona d'azione», come una «zona di effetti».

Nel campo istologico gli accenni a lesioni «locali o localizzate» sono piuttosto scarsi, ma il loro rilievo è quanto mai costante e generale dall'applicazione dei concetti sopraricordati ne risulta facile e logica la messa in evidenza.

Dalle varie citazioni degli AA. si possono sempre dedurre i concetti informativi, che stanno alla base dell'ipotesi della «zona d'azione»: questa messa a punto vuole soprattutto dare un'unità interpretativa a vari fatti annotati e descritti, ma non interpretati in questi termini esatti ed estesi, valorizzandoli ed unificandoli in una *sintesi unitaria*. Anche perchè qualsiasi azione da raggi X deve essere interpretata dal punto di vista fisico, energetico, chimico e chimico-fisico, rapportandola poi su terreno istologico in campo radiobiologico, tenendo ben presente che il corpo irradiato va inteso nel suo complesso e nei mutui rapporti energetici, sia statici che dinamici, dei singoli suoi componenti elementari — atomi e molecole — specie dal punto di vista strutturalistico.

E questa è soprattutto la *parte personale del lavoro*, che debbo sottolineare per far meglio comprendere la mia presa di posizione.

Perciò posso ulteriormente confermare la definizione della «zona d'azione», punto per punto, soprattutto che la «zona d'azione» deve corrispondere ad un «volume tridimensionale» e va considerata come «zona di effetti» da «sommazione» di tutte le varie energie in gioco, nel senso più volte specificato: ne ribadisco l'importanza nel campo teorico ma anche nel campo pratico — terapeutico soprattutto —, per cui *qualsiasi dose* di energia radiante va considerata sotto questo parametro di ordine generale, cioè come «energia dissipata localmente in tante zone d'azione» e su questa linea direttiva raffigurarci e considerare «*localisticamente*» gli effetti eventuali, qualunque sia l'energia radiante, la dose e la tecnica seguita nella somministrazione: quindi

anche l'instaurarsi e lo svolgersi di processi riparativi o spiegare eventuali cause di successi o di insuccessi terapeutici.

BIBLIOGRAFIA

- ALBERTI W. und POLITZER G., 1923. — *Über den Einfluss der Röntgenstrahlen auf die Zellteilung. I^o Mitteilung.* Arch. mikr. Anat. und Entwl., **100**: 83-109.
- , 1924. — *Idem. II^o Mitteilung.* Arch. mikr. Anat. und Entwl., **103**: 284-307.
- ALLEN A. O., 1952. — *Mechanism of decomposition of water by ionizing radiations.* Disc. Far. Soc., **12**: 79-87.
- BAKENDALE J. H., 1952. — *Discussione riportata in:* Disc. Far. Soc., **12**: 256.
- BEADLE C. W., 1951. — *Chemical Genetic.* In: « Genetic in the 20th. Cen. » a cura di L. C. Dunn, Mac Millan, New York.
- BENZER S., 1955. — *Fine structure of a genetic region in bacteriophage.* Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., **41**: 344-354.
- , 1957. — *The elementary units of heredity.* In « The Chemical Basis of Heredity » a cura di W. D. Mc Emroy e Bentley Glass, The Johns Hopkins Press. Baltimore.
- BLOCH D. P., 1955. — *A possible mechanism for the replication of the helical structure of deoxyribonucleic acid.* Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., **41**: 1058-1064.
- BOURNE G. H., 1950. — *Recent discoveries concerning mitochondria and Golgi apparatus and their significance in cellular physiology.* J. Royal Micr. Soc., **70**: 367-382.
- BURTON M., 1958. — *Radiolyse de liquides organiques.* In: HAISSINSKY 1955.
- BUZZATTI-TRAVERSO A. e CAVALLI L., 1957. — *Teoria dell'urto e unità biologiche elementari.* Longanesi, Milano.
- CASATI A., 1928. — *Sul potere « riducente » dei raggi X.* Radiol. Med., **15**: 1215-1228.
- , 1929a. — *Sulla presenza di « zone d'azione » nei corpi irradiati come effetto dell'irradiazione con raggi X.* Radiol. Med., **16**: 1138-1147.
- , 1929b. — *Experimentelle Untersuchungen über die Röntgenwirkung auf das Knochenmark. I^o Mitteilung.* Strahlen., **32**: 721-738.
- , 1930. — *idem. II^o Mitteilung.* Strahlen., **38**: 315-321.
- , 1931a. — *Le « condizioni generali » come fattore di radiosensibilità (con speciale riguardo al midollo osseo). I Nota.* Pathologica, **23**: 417-422.
- , 1931b. — *Idem. II Nota.* Pathologica, **23**: 494-497.
- , 1932. — *Experimentelle Untersuchungen über die Röntgenwirkung auf das Knochenmark. III^o Mitteilung.* Strahlen., **43**: 582-588.
- , 1933. — *Ricerche sperimentali sull'azione dei raggi X sul midollo osseo. IV Nota.* Radiobiologia, **1**: 49-53.
- , 1950a. — *Questioni di Radiobiologia generale. 1. Considerazioni sui fenomeni da raggi X nei corpi irradiati.* Radioter. Radiobiolog. Fis. Med., **3**: 49-60.

- CASATI A., 1950b. — *Questioni di Radiobiologia generale*. 2. « Zona d'urto » e « zona d'azione ». Radioter. Radiobiol. Fis. med., **3**: 173-187.
- , 1951. — *Questioni di Radiobiologia generale*. 3. « Specificità di assorbimento » e « specificità d'azione »? Radioter. Radiobiol. Fis. Med., **4**: 180-190.
- , 1951a. — « Azioni chimiche secondarie » e « azione indiretta delle radiazioni ». Radioter. Radiobiol. Fis. Med., **5**: 261-266.
- , 1951b. — *Teoria unitaria sul meccanismo d'azione dei raggi X*: « potere riducente » e « azioni chimiche secondarie ». Radiol. Med., **37**: 1020-1028.
- , 1956. — *Questioni di Radiobiologia generale*. 4. Strutturistica e Radiosensibilità: considerazioni sull'« attivazione dell'acqua ». Radioter. Radiobiol. Fis. Med., **11**: 251-272.
- , 1958. — *Questioni di Radiobiologia generale*. 5. Eccitazione, ionizzazione, scissione e dissociazione nelle azioni chimiche da raggi X. Radiol. Med., **44**: 149-156.
- CASATI A. e CAFISSI G., 1935. — *Ricerche sperimentali (radiotanatologiche) sul fegato irradiato a contatto*. I Nota. Res. I Congr. Nuclei Ital. di Radiobiologia, pp. 100-1064. Zanichelli, Bologna.
- , 1937. — *Idem*. II Nota. « III Cong. Nuclei Ital. di Radiobiologia », in: Archivio Radiologia e Biofisica, **5**: 242-243.
- , 1941. — *Ricerche sperimentali (radiotanatologiche) sul rene irradiato a contatto*. Scrit. Ital. di Radiobiologia, **8**: 124-137.
- CASPERSSON T., 1950. — *Cellgrowth and cell function*. Norton, New York.
- CHARGAFF et al., 1935. — *Separation of calf thymus deoxyribonucleic acid into fractions of different composition*. Nature, **172**: 289-292.
- CIARANFI E., 1955. — *Cenni sopra l'azione patogena dell'energia radiante*. Minerva Medica **46**: 920-928.
- , 1957. — *Enzimi e patologia cellulare*, da « Enzimi in Medicina », Simposio, Torino pp. 63-104.
- DALE W. M., 1954. — *Basic Radiation in Biochemistry*. In: HOLLAENDER 1954.
- , 1955. — *Modern Trends in Radiation-biochemistry*. In: HAISSINSKY 1955.
- DE GROUCHY J., 1958. — *L'hérédité moléculaire*. Ediz. Istit. Gregorio Mendel, Roma.
- DE ROBERTIS E. et al., 1955. — *General Cytologie*. Saunders, Philadelphia.
- DE WURST H. A., SAMUEL A. H. and MAGEE J., 1954. — *A theoretical Survey of the Radiobiology and radiochemistry of water and aqueous solutions*. Radiation Research, **1**: 62-84.
- DURYEE W. R., 1939. — *Comparative effects of X-radiation on isolated and non isolated nuclei*. Anat. Rec., **75**: 144-168.
- V. EULER H. und v. HEVESY G., 1944. — *Wirkung der Röntgenstrahlen auf den Umsatz der Nukleinsäure im Jensen-Sarkom*. Ark. Kemi. Mineral. Geol., **17A**: 1-16.
- FANO U., 1954. — *Principles of Radiological Physics*. In: HOLLAENDER 1954.
- FRANCK J. and PLATZMANN R., 1954. — *Physical Principles underlying photochemical radiation-chemical and radiobiological Reactions*. In: HOLLAENDER 1954.

- FURST M. et al., 1951. — *Effects chimiques dus à l'excitation par les electrons secondaires produits par les rayonnements ionisants*. J. biol. Chem., **191**: 239-256.
- GALE E. F., 1956. — *Nucleic acids and Enzyme synthesis*. In « *Enzymes: Units of biological Structure and Function* ». Henry Ford Hosp. Symp. Gaebler, Academic Press Inc., New York.
- GERRITSEN A. N., 1948. — *Ionisation bei alpha-particles in liquids at low temperature*. Physica, **14**: 381-406 e 407-424.
- GLASS B., 1955. — *Pseudoallels*. Science, **122**: 233.
- GRAY L. H., 1947. — *The distribution of the ions resulting from the irradiation of living cells*. Brit. J. Radiology, Suppl. **1**: 7-15.
- , 1954. — *Some caratteristics of biological damage induced bei ionizing Radiation*. Research, **1**: 189-213.
- , 1955a. — *Aspects phisiques de la radiobiologie*. In: HAISSINSKY 1955.
- , 1955b. — *Problème des relations entre le rendemente radiochimique et les aspects phisiques de la qualité des radiations*. J. de Chem. Phys., **52**: 519-527.
- GRANICK S. and PORTER K. R., 1947. — *The structure of the spinach chloroplast as interpreted with the electron microscope*. Amer. Jour. Bot., **34**: 545-550.
- HAISSINSKY, 1955. — *Actions chimiques et biologiques des Radiations*. Masson, Paris.
- HOLLAENDER, (1954). — *Radiation Biology*. Mc Graw-Hill Book Com., New York.
- JAFFÉ G., 1923. — *Zur Theorie der Ionisation in Kolonnen*. Ann. Phis., **42**: 303-344.
- KARA-MICHAILOVA E. and LEA D. E., 1940. — *Ionisation measurements in gases at hig pressures*. Proc. Cambr. Phil. Soc., **36**: 101-123.
- KAUFMANN B. P., 1954. — *Chromosome aberrations induced in animal cells by ionizing radiations*. In: HOLLAENDER 1954.
- KLEMPERER O., 1927. — *Über Aufloesung Wilsonscher Alphastrahlenbahnen in Einzel-tropchen*. Z. phys., **45**: 225-230.
- LEA D. E., 1946. — *Action of radiation on living cells*. Cambridge Univ. Press, Cambridge.
- , 1947. — *The action of radiations on dilute acqueous solutions: the spatial distribution of H and OH*. Brit. J. of Radiology, Suppl. **1**: 59-63.
- LEDERBERG J., 1956. — *Genetic transduction*. Amer. Scientist, **44**: 264-270.
- LEDERBERG J. et al., 1953. — *Genetic studies of lisogenicity in E. coli*. Genetics, **38**: 59-63.
- LEDERBERG J. and TATUM E. L., 1953. — *Sex in bacteria: genetic studies 1945-1952*. Science, **118**: 169-175.
- LÉFORT M., 1950. — *Actions des rayonnements ionisants sur l'eau et les solutions acqueses*. J. de Chem. Phys., **47**: 624-643 e 776-794.
- , 1954. — *Chimie des Radiations des solutions acqueses*. In: HAISSINSKY 1954.
- LEVI G., 1954. — *Trattato di Istologia*. U.T.E.T., Torino.
- MAGEE J., 1955. — *Schema de diffusion des radicaux autour des trajectoires des particules ionisantes dans les liquides*. J. de Chem. Phys., **52**: 528-535.

- MAGEE J. and SAMUEL A. H., 1953. — *Chemistry of Radiation chemistry. II Track-effects in Radiolysis of water*. J. of Chem. Phys., **21**: 1080-1087.
- MONOD J. et COHN M., 1952. — *La biosynthèse induite des enzymes: (adaptation enzymatique)*. Adv. in Enzymologie, **13**: 67-84.
- NOYES R. M., 1951. — *Wall effects in photochemically induced chain reactions*. J. A. Chem. S., **73**: 3039-3043.
- PALADE G. E., 1956. — *Electron microscopy of mitochondria and other cytoplasmic structures*. In « Enzymes: Units of biological structure and function ». Henry Ford Symposium O. H. Gaebler, Academic Press Inc., New York.
- PORTER K. R., 1959. — *Da una conferenza al I simp. Soc. di Cancerol. Pisa*.
- POZZA F. et al., 1959a. — *Variazioni morfologiche indotte dalle radiazioni ionizzanti sulle ultrastrutture della cellula epatica di ratto: influenza del frazionamento della dose e del fattore tempo*. Radiol. Med., **44**: 483-487.
- , 1959b. — *Modificazioni biochimiche indotte dalle radiazioni ionizzanti sulla cellula epatica: attività succinodeidrogenasica*. Radiol. Med., **45**: 685-688.
- PROTTI G., 1956. — *Imprescindibilità della microscopia elettronica in Biologia*. Igiene e Sanità Pubblica, **12**: 1-15.
- RAJEWSKY B. et al., 1959. — *Strahlentherapie von Hautkrankheiten* in « Handbuch der Haut- und Geschlechtskrankheiten ». Band V/2, Springer Verlag, Berlin.
- READ J., 1949. — *The lateral distribution of ions across the track of an ionizing particle. I*. Brit. J. of Radiol., **22**: 366-378.
- , 1951. — *Idem. II*. Brit. J. of Radiol., **24**: 345-347.
- RIS H., 1952. — *The submicroscopic structure of chromosomes*. Records Genet. Soc. Amer., **21**: 63-72.
- RUBIN I. e MIKHEEVA N., 1958. — *L'influenza delle radiazioni sulla composizione chimica dei mitocondri*. Doklady Akad. Nauk. SSSR, **122**: 867-879.
- SCHWARZ D., 1955. — *Speculations on gene action and protein specificity*. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., **41**: 300-307.
- SCOTT J. F., 1948. — *Electron micrographie studies on sodium desoxyribose nucleate*. Bloch. et Biophys. Acta, **2**: 1-6.
- SIRTORI C., 1958. — *I contributi della microscopia elettronica in campo normale e patologico*. La Rassegna Medica, **35**: 89-105.
- SPIERS F. W., 1951. — *Dosage in irradiated soft tissue and bone*. Brit. J. of Radiol., **24**: 365-370.
- STRAUSS B. S., 1955. — *A mechanism of gene-interaction*. Amer. Naturalist, **89**: 141-150.
- VILIER R. W. et al., 1950. — *Studies on the relationships of Vit. B-12, folic acid, thiamine, uracil and methyl group Donors in persons with pernicious anemia and related megaloblastic Anemias*. Blood, **5**: 695-717.
- ZINGONI U., 1951. — *La depolimerizzazione degli acidi nucleici studiata con l'impiego della ribonucleasi salivare*. Arch. di Fisiol., **51**: 202-215.

- ZINGONI U., 1956. — *Alcuni aspetti morfologici e funzionali degli istiociti della milza in relazione al metabolismo degli acidi nucleinici*. Lo Sperimentale, **106**: 193-204.
- ZIRKLE R. E., 1955. — *The radiobiological Importance of Linear Energy Transfer*. In: HOLLAENDER 1954.
- WARBURG O. et al., 1912. — *Ueber Atmung in abgetöten Zellen und in Zellfragmenten*. Pflüger's Arch., **148**: 295-310.
- WATSON J. D. and CRICK F. H. C., 1953. — *The structure of nucleic acids. A structure of deoxyribonucleic acid*. Nature, **171**: 881-883.
- , 1953. — *The structure of deoxyribonucleic acid*. Cold Springs Harbor Symp. Quant. Biol., **18**: 123-132.
- WEISS J., 1955. — *Effects chimiques dus à l'excitation par les electrons secondaires produits par les rayonnements ionisants*. J. Chim. Phys., **52**: 539-542.
- WILLIAMS E. J., 1933. — *Der Energie Verlust schneller elektrisch geladener Teilchen*. Phys. Rev., **40**: 881-894.

SUMMARY

A critical review of the recent literature on radiology further confirms the theoretical concept of the «action zone» (CASATI 1929) in the physical, energetic, chemical and hystological fields: all of the authors clearly affirm the necessity of establishing the «distribution» and the «spacial localization» of elementary physical events, of active energy and of the chemical products formed.

Thus the «track» of the ionizing particles assumes a particular importance of its own as the «seat» of primary physical events and, according to ZIRKLE the sum of all tracks corresponds to the total volume of the tracks formed; thus the corresponding secondary events are considered as being the cause of those effects which are «locally» derived; so, too, the ionizations are localized on the track of the primary particles and the surrounding excitations.

The same concept by TEL considers the dissipated energy in all the tracks of the various particles and studies their distribution for «unity of length», arriving at the «localistic» and «spacial» determination of the energy given off in the production of both ionizations and excitations. TEL also considers a possible mechanism of «energetic additivity» — complete and incomplete — for the observed effects.

In the chemical field, studies have been made of the distribution along the tracks of positive ions (at the center) and negative ions (at the periphery), of the radicals and of the excited atoms and molecules. In this regard, we must bear in mind the possibility of subsequent chemical reactions — either radical or molecular reactions, competitive reactions and secondary chemical reactions. The terms «répartition locale des ions», «spur», «grappe», «hot spot», «cage», «little region» — all of which indicate a

« zone » — are clearly meant to designate a « localization » of various products. This is perfectly in accord with the fundamental concept which considers the « action zone » as a « zone of effects ».

Rather scarce mention is made of « local » or « localized » lesions in the hystological field, always described and not observed but they have not been given their due consideration. Through the application of the above ideas it is easy and logical to place them in evidence.

The concepts which form the basis of the « action zone » hypothesis may be deduced from a study of the writings of the various authors; this review is chiefly intended as an interpretive summary of the facts which have been set forth heretofore, but which have not been interpreted in these very terms. It is hoped that this work will serve to evaluate and unify these concepts in a composite whole. Any X-ray action must be interpreted from a physical, energetic, chemical and physio-chemical standpoint and correlated on a hystological basis in the radiobiological field. We must remember that an irradiated body must be considered in its entirety and in reciprocal energetic rapport — both static and dynamic — with its single elementary components (atoms and molecules), and finally in the light of its structural composition.

Therein lies my personal contribution to the work, which must be stressed in order to better clarify the position I have taken.

Thus we are able to reaffirm my preceding definition of the « action zone », point by point. This zone must correspond to a « tridimensional volume » and is to be considered the « zone of effects » of the « additivity » of all the various energies at work. Its importance is reconfirmed in the theoretical, the practical and — most important — the therapeutical field. Any dose of radiant energy must be considered as locally-dissipated energy in many « action zones ». In this way we are able to explain the reparative processes and the causes of therapeutical successes or failures.

CYTOGENETICAL STUDIES ON SOME ORNAMENTAL JASMINES

by

MRIDULA DATTA

Bose Institute, Calcutta, India

(with Plates LXXV-LXXVII and 36 text-figures)

Received: September 10th 1959.

INTRODUCTION

Jasmines are well known ornamental plants cultivated in many parts of the world for their attractive and sweet scented flowers. They are scandent or erect shrubs belonging to the genus *Jasminum* Linn. of the family Oleaceae. *Jasminum* comprises about 300 species (KOBUSKI 1932, TAYLOR 1945) of which about 43 are reported to be from India (HOOKER 1894). Several workers (HOOKER 1894, KOBUSKI 1932), are of opinion that their distribution is pantropical and they have a possible centre of origin in the area covered by China, Malayasia and the Himalayas. It is also mentioned (TAYLOR 1945) that all the species belonging to the genus *Jasminum* are considered to be cultivated forms and have been so for such a length of time that no wild forms exist today and affinities to related families are difficult to trace.

Chromosome numbers of *Jasminum* species have been from time to time reported by SAX and ABBÉ (1932), BOWDEN (1940) and DUTT (1952b). KRISHNASWAMY and RAMAN (1948), RAMAN (1955a, b, c) and SHARMA and SHARMA (1958) have reported on the cytogenetics of some species of jasmines. Regarding its systematic position HUTCHINSON (1926) places the family Oleaceae under Loganiales (Order 46) of the division Metachlamydae of the Dicotyledons. TAYLOR (1945) has worked out a detailed key for both the family and the genus.

The Indian ornamental jasmines flower profusely, but set seed very rarely and are propagated chiefly by vegetative means. The facts of the antiquity of the genus and of its isolation from present day forms place it as a distinct morphological and cytological group, with promise of possessing an interesting meiotic cycle. Of the species and

varieties discussed, some are in common with those dealt with by RAMAN (1955*b, c*) and SHARMA and SHARMA (1958), but as meiotic and pollen studies have not been reported fully in previous works they are recorded here together with departures if any from previous observations. The following species are included in this :

Jasminum auriculatum Vahl. - vernacular Bengali «ban jui»

Jasminum calophyllum Wall. - vernacular Bengali «jui, juthika»

Jasminum grandiflorum Linn. - vernacular Bengali «chameli»

Jasminum Sambac Ait. (3 types).

Type I - vernacular Bengali «mallika» (single flowered)

Type II - vernacular Bengali «bael» (double flowered)

Type III - vernacular Bengali «bael» (double flowered).

Jasminum pubescens Willd. (2 types)

Type I - vernacular Bengali «kunda» (small flowered)

Type II - vernacular Bengali «kunda» (large flowered).

MATERIAL AND METHODS

J. calophyllum, *J. grandiflorum* and *J. Sambac* (Type I) were collected from Rambha (Orissa) and Calcutta (W. Bengal), *J. Sambac* (Type II) and *J. pubescens* (Type I) from Calcutta, *J. Sambac* (Type III) from Rambha, and *J. pubescens* (Type II) from Jalpaiguri (W. Bengal).

Specimens were identified by comparison with the type sheets at the Indian Botanic Gardens, Shibpur, W. Bengal, and validity of names were verified from the Index Kewensis.

Seeds are rarely set and usually not viable. Germination could not be induced by temperature treatments. Mitotic studies were confined to those plants growing in Calcutta as root tips had to be obtained from cuttings and layerings. Root tips were fixed in Lewitsky's fluid with the addition of saponin powder.

Meiosis was of short duration, the first and second divisions being completed from within 15 minutes to half an hour.

Most standard fixatives including NAVASCHIN and BELLING's modification of it were unsuitable, best results being obtained with medium

Flemming and Karpechenko's fluid in which tap water was substituted for distilled water, and a trace of saponin powder was added.

After fixation and prior to mordanting in 1% chromic acid (24 hrs), preparations were cleared in alcoholic H_2O_2 (20 vols) or aqueous $Na CO_3$. Newton's crystal violet iodine technique proved superior to SEMMEN'S and BHADURI'S (1939) Feulgen and Light green schedule. In case of *J. calophyllum*, as both alcoholic fixatives and aqueous fixatives containing either chromic acid or osmium tetroxide proved unsuitable, after some trials, mercuric chloride was substituted as the fixing agent for proteins, and good plates were obtained. The fixing fluid and staining procedure have been described elsewhere (DUTT 1952a).

The figures were drawn with a drawing prism at a table magnification of approximately $\times 3500$, using a 1.3 n. a. apochromatic objective and compensating eyepiece n. a. 18 with a Leitz research microscope.

Photomicrographs were taken with a Leica camera and Leitz, using slow speed fine grain film. Phototube a Leica camera with Elmar f/3.5 lens was used.

OBSERVATIONS

I. MORPHOLOGICAL DESCRIPTIONS

The jasmine flowers are common throughout the length and breadth of India. The garden forms which constitute the majority are common to all regions and all types of soil in India. As the vernacular names of such forms are necessarily legion, a pertinent description of each form is included below as helpful in comparing it to flora already worked out (KRISHNASWAMY and RAMAN 1948, RAMAN 1955, SHARMA and SHARMA 1958).

The species have been grouped according to KOBUSKI'S (1932) key.

Trifoliata

Jasminum auriculatum Vahl. (Plate LXXV, fig. A).

Vern : « ban-jui ».

Leaves : Compound, three foliate. Lateral leaflets small and auriculate, sometimes leaves simple.

Inflorescence : Lax cymes with a grey pubescence, many flowered.

Flowers : Small, white, regular or sub-regular. No abnormalities have been noticed.

Calyx : Teeth minute, persistent.

Corolla : 5-7 petal lobes. Salver shaped.

Fruit : More fruits are formed than in the other jasmines. Glistening black berries, with 2 seeds in each.

N. B. — According to KRISHNASWAMY and RAMAN, this species is BOWDEN's (1940) *J. affine*.

Jasminum calophyllum Wallich (Plate LXXV, fig. B).

Vern : « jui » or juthika ».

HOOKEER (1894) gives a *J. courtalense* as a synonym. This common species is strangely enough not mentioned in ROXBURGH's (1874) « Flora Indica ».

Leaves : Glabrous, yellowish green in colour, non-hairy. Internodes long, subequally trifoliate, lower pairs sometimes reduced.

Inflorescence : Lax, 10-50 flowered cymes, trichotomously compound.

Bracts : Minute.

Calyx : Lobes minute, persistent, subtruncate.

Corolla : White, fragrant, corolla lobes $1/4$ - $1/2$ inch. Elliptic. Corolla tube $3/4$ inch.

Androecium : Stamens usually two, abnormally one. Three and four anthers have been noticed.

Gynaecium : Carpels $1/5$ inch. two, ellipsoid.

Fruit : Rarely formed, black, fleshy, one seeded berry.

This species is wholly sterile being propagated exclusively by vegetative means. Sections of fertilized flowers have shown that the ovules shrivel up on the second day. Fruits dry up on the third or fourth day after fertilization. Often the androecium and gynaecium may be seen to have dried up in the young unopened flower. Sometimes the whole inflorescence branch dries up and withers away. As a result, most fruits are lost before the seed setting stage. Those which are rarely formed have non-viable seeds.

Pinnatifolia

Jasminum grandiflorum Linn. [*J. officinale* var. *grandiflorum* (L.) Kobuski].

Vern : «chameli» or «chambeli».

HOOKEE finds it hardly distinguishable from *J. officinale*.

BOWDEN (1940) in his work on the winter hardiness of plants records a slight difference between the above two forms in that :

J. grandiflora from India is «non-hardy» and *J. officinale* from China and Persia is «less-hardy».

In his comprehensive treatise on the Chinese jasmines, KOBUSKI (1932) decides that it is best to retain the Linnean name «*grandiflorum*» as a horticultural form of *J. officinale*, thus making it *J. officinale* var. *grandiflorum*. He states the following as synonyms.

J. vulgatum Lamarck, *J. viminalis* Salisbury and *J. affine* Lindley.

The many specimens collected in and around Calcutta correspond to Roxburgh's type sheet of *J. grandiflorum* Linn. The Linnean name has been retained for present purposes.

Leaves : Leaflets opposite pinnate, Rachises slender, long.

Bracts : Minute.

Flowers : White, tinged with pink at tips of corolla lobes, not numerous.

Calyx : Teeth linear, persistent.

Corolla : White, flushed with pink. Tube long.

Androecium : Two included stamens.

Fruit : Fruits are usually formed, but do not reach seed setting stage, as the inflorescence branch dries up.

A variant of the usual hermaphrodite form was noticed in the gardens of Calcutta, of which an account has been previously published (DUTT 1950). The calyx, corolla and androecium of the flower are of the usual type and externally no difference can be detected. The anomaly lies in the fact that the gynaecium is not formed at all, but is replaced completely by a racemosely growing shoot of stamens. The flowers are therefore unisexual and male. The stamens in the redundant whorl are petaloid but not abortive. The meiotic division in their P.M.C. s is only slightly irregular in comparison to the normal flower. A large percentage of the pollen is completely formed.

*Unifoliata**Jasminum Sambac* Ait.

This is one of the better known jasmines, commonly called « Arabian jasmine ». It is found throughout India and used for worship in temples. KRISHNASWAMY and RAMAN (1948) have recorded five varieties from the South.

KOBUSKI finds that, « the synonyms of such a popular species are many, but the species itself is so distinct that as a rule the synonym can be easily recognized as such ». He lists 13 synonyms.

Five varieties were collected for the present study, but the P.M.C. were found to be at the dividing stage in only three of them, which included both single and double flowered types.

A few details of the various forms studied are enumerated below. It will be noticed that none of these forms are common with those previously published :

Calyx pubescent, calyx lobes linear, subulate, 0.25 inch or longer, erect or climbing. Carpels globose. Fruit black.

The varietal characters have been tabulated in Table I. Meiosis was obtained in varieties I, II and III and mitotic studies were possible in the first two only. Each plant sets about 4 to 6 seeds at the end of the flowering season, of these some might be viable so as to aid in species distribution. In India, this popular species is propagated chiefly by vegetative means.

Jasminum pubescens Willd. (Plate LXXVII, fig. F).

It is a common garden form called « kunda ». KOBUSKI lists five synonyms for the species which he finds should properly be called *J. multiflorum* (BURMAN 1786) f Andrews.

Habit : Suberect shrub. Branchlets pubescent.

Leaves : Large, shortly petioled. Opposite superposed. Exstipulate. Hairy. Ovate. Acute tip. Venation marginal. Blades not as thin as *J. Sambac* nor with such prominent reticulations. Petioles 1/3 inch or less.

Inflorescence : Dense umbels of simple cymes. Capitulate. Rachises short, terminal.

Bracts : Usually present. Ovate, lanceolate, leaflike, minute. 1/6 inch.

Flowers : Large and white.

	(Plate LXXVI, fig. C)	(Plate LXXVI, fig. D)	Type III (Plate LXXVII, fig. E)	Type IV	Type V
Habit	Twiner, Internodes 1-1.5", granular.	Small shrubs, internodes 1-1.5", stems smooth.	Woody bush, Internodes 2".	Slender woody twiner, Internodes long 2.0".	Small woody bush. Very hairy. Hairs greyish white, granular. Internodes short, 0.5".
Leaves	Hairs simple, opposite, entire, with acute tip. Margin wavy. Thin blade 1-1.5" x 2-2.5". Nerves prominent underneath. Petiole 0.2".	Simple opposite. Blades orbicular. Tip obtuse. Crumpled margin entire. Nerves prominent underneath. Blades 0.6-0.8" x 0.8". Petiole 0.2-0.3".	Simple, acute, coriaceous. Yellow wavy. Margin 1.5" x 1.0", not glabrous. 2 or 3 to each node. Petiole 0.2".	Simple, opposite. Deep green, glabrous. Margin wavy. Elliptic. Acute tip. 1.5" x 1.0". Petiole hairy, 0.2".	Simple, 2 or 3 at each node. Small, leathery, elliptic. Acute tip. Margin slightly wavy. Dark green, coriaceous, Blade 0.8"-1" x 0.5".
Inflorescence	Simple terminal or axillary cymes.	Simple cymes.	Simple cymes.	Simple, lax cymes.	Simple cymes.
Flowers	Bracts linear. 0.15"-0.50".	Bracts usually absent. Peduncle 0.4-0.5".	Small. Elliptic. Peduncle 0.2". Bracts linear.	Large, white. Peduncle 0.2". Bracts small, many.	Small, dense, dirty white. Peduncle short. Bracts 2-3, few linear.
Calyx	6-7 linear. 0.25"-0.3".	Linear, Half length of corolla tube.	9-10, linear, Tube ridged below.	6-7, nearly as long as corolla tube.	6-7, linear, longer than corolla tube.
Corolla	5-6. Single whorled. Buds tight, pointed.	Numerous whorls, tightly packed. Buds rounded. Corolla tube short.	Numerous petals, in many whorls. Bud pointed, creamy white.	Buds pointed, 6-7 petals, large corolla tube.	Petals numerous, in many whorls. Dense. Corolla tube short, broad.
Androeceum	2 or abnormally more. Perfect. Filaments short.	2 or less. Filament, connective and anthers petaloid.	Style longer than corolla tube. Stigma shorter than stamens.	Stamens included.	Stamens 2, Perfect. Included.
Gynaecium	Style shorter than stamens. Less than half the length of corolla tube.	Style longer than corolla tube. Stigma shorter than stamens.		Style longer than corolla tube.	
Fruit	Black berry.	Black berry.	Rambha.		
Place of collection	Calcutta.	Calcutta.			
Vernacular	« Mallika » (single flowered).	« Bael, Bel » (double flowered).	« Mallige » (double flowered).	Rambha (single flowered)	Dolphin's nose, Vishakhapatnam. (double flowered).

Calyx : 6-7 linear, prominent, persistent. Teeth $1/5 - 1/2$ inch long. Half the length of corolla tube.

Corolla : 8-9. Imbricate in bud. Tube and lobes of equal length. White. Slightly zygomorphic.

Androecium - Included : Anthers large, oblong, half the length of style.

Gynaecium - Included : Stigma bilobed. Style long, Carpels 2.

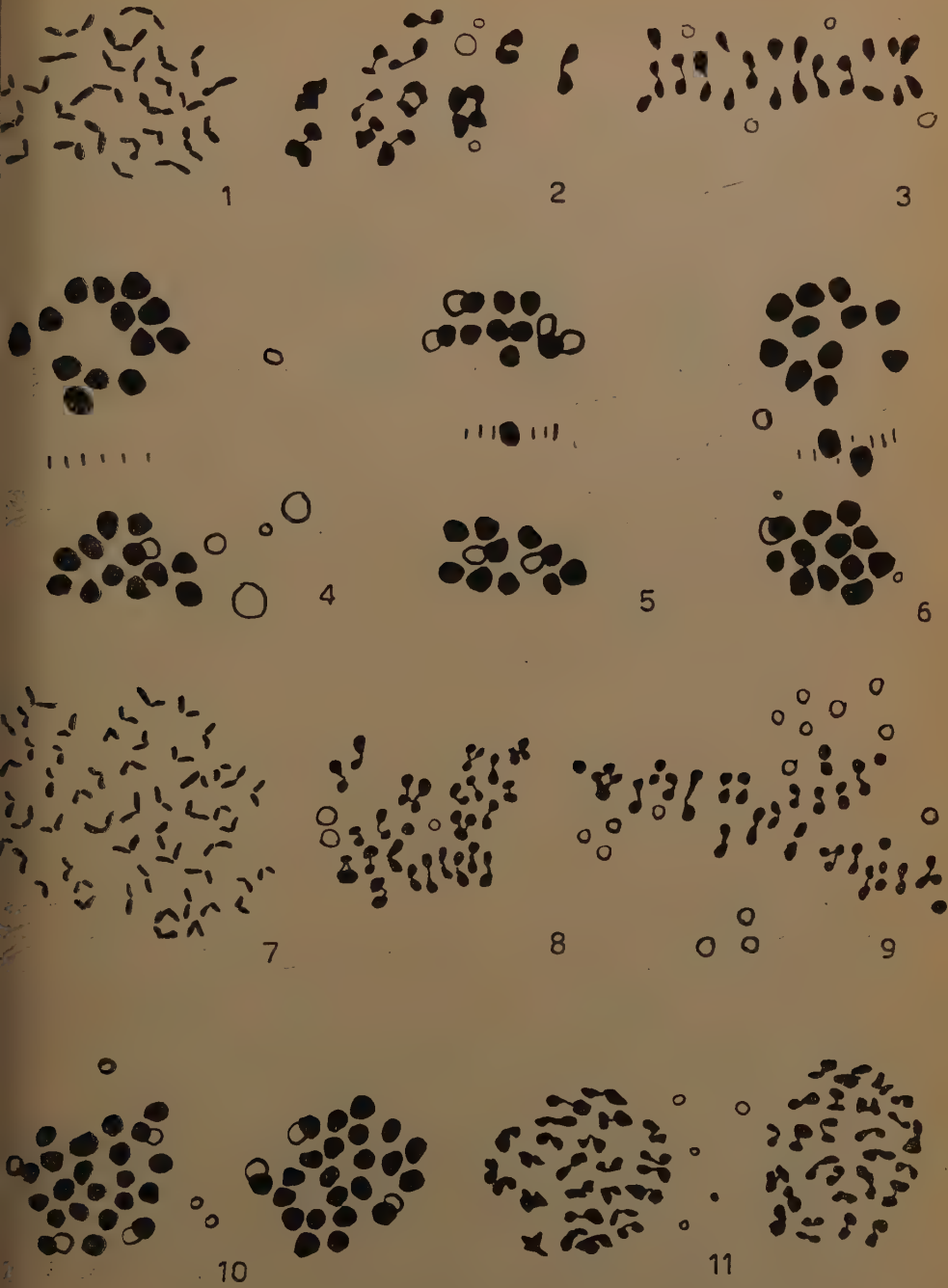
Fruit : 2-seeded. Fleshy with persistent calyx. Usually shed before ripening.

The material was collected from Calcutta in the plains, and from Jalpaiguri in the hills. The morphological characters of both collected types were the same, except that all parts, i. e., leaves, flowers etc. of the plains form were larger than those of the hill variety. The above description pertains to the larger flowered plains type. It was subsequently determined from cytological studies that the plant from Calcutta was a triploid and that from the hills a diploid. The triploid form was met with in Calcutta but not the diploid.

The fruits of the triploid dried up on the 3rd or 4th day after the flowers were shed. Sections of the ovary before and after flower opening showed that the full and complete ovule began to shrivel on the second day after flower opening. In other cases the whole umbel dried up and dropped away. In contrast to this, the diploid plant bore an abundance of fruits and seeds.

Jasminum auriculatum Vahl. : $2n = 26$. Figs. 1-6 (x 3500). — Fig. 1. Somatic plate with 26 chromosomes. There are eight chromosomes with secondary constrictions. — Meiosis : Metaphase I. Fig. 2. Side view, 11 bivalents and one quadrivalent ring. — Anaphase I. Early. Fig. 3. Regular separation of 11 bivalents. Cytoplasmic droplets are given in outline. — Late : Fig. 4. Regular separation. — Figs. 5, 6. Irregular separation, there being one and two laggards, respectively.

Jasminum calophyllum Wall. : $2n = 52$. Figs. 7-11 (x 3500). — Fig. 7. Somatic plate with 52 chromosomes, of which one has a secondary constriction. These chromosomes are the smallest among the jasmines. — Meiosis : Metaphase I. Fig. 8. The arrangement is $1_1 19_{II} 3_{III} 1_{IV}$. Chromosomes in a chain may be unequal in size. — Fig. 9. The configurations are $4_1 19_{II} 2_{III} 1_{IV}$. — Anaphase I. Late : Fig. 10. A regular 26-26 separation. — Metaphase II. Fig. 11. As a result of irregular distribution there are 25 bivalents in one dyad and 27 bivalents in the other.



II. CYTOLOGICAL OBSERVATIONS

A) Mitosis.

The chromosome counts of the material in this study taken from sections and smears of root tips and leaf tips before commencement of meiosis, have been already reported by the author (DUTT 1952b). The haploid number is considered to be $n = 13$ (DARLINGTON and WYLIE 1955). There may be some irregularities in the somatic plates of the type reported by SHARMA and SHARMA (1958), e. g. in *J. Sambac* type II the number $2n = 24$ occurred. Chromosomes could not be fixed well enough to work out their karyology, though some were constricted (figs. 1, 7, 12, 16, 20, 31). In general, data such as the size range between chromosomes and the maximum number of constrictions per chromosome, conform usually to the figures published recently by SHARMA and SHARMA (1958), they have therefore been excluded from the present account. The size of chromosomes is seen to differ according to the size of the cell in which they occur, being smaller in leaf tip cells than in those of the root tip, and in the root tip being larger in the middle-cortical cells. It is reconfirmed that the chromosomes are small in size and that size differences are not marked. Of the mitotic figures so far published, only those of

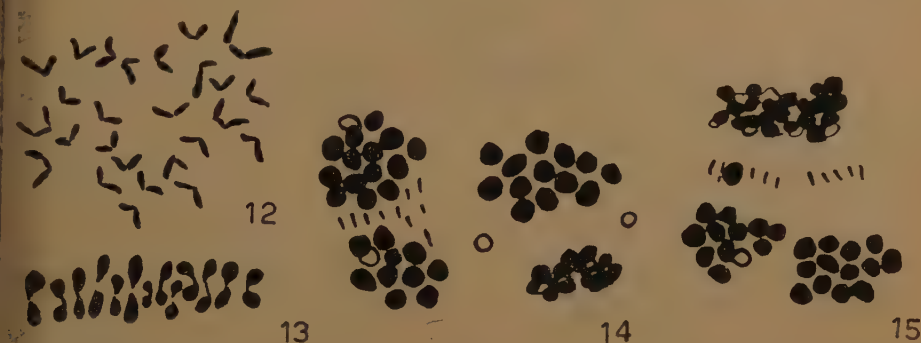
TABLE II

Species or variety	Average total length of complement in μ	Ploidy
<i>J. auriculatum</i>	40.4	diploid
<i>J. grandiflorum</i>	38.4	-do-
<i>J. Sambac</i> (type I)	38.2	-do-
<i>J. Sambac</i> (type II)	37.4	-do-
<i>J. pubescens</i> (type II)	54.7	triploid
<i>J. calophyllum</i>	69.9	tetraploid

TAYLOR (1945) and SHARMA and SHARMA (1958) show critically fixed chromosomes, *Jasminum* presenting difficulties in the way of fixation, presumably due to the heavy oily ground plasm.

In the characters worked out by SHARMA and SHARMA in their karyology of the species, some interesting correlations to meiotic behaviour can be traced. Mitotic data is confined to the following.

These readings reduced to round figures would indicate that the total length of the diploid complement is 40μ , of the triploid is 55μ and of the tetraploid 70μ .



Jasminum grandiflorum Linn.: $2n = 26$. Figs. 12-15 ($\times 3000$). — Fig. 12. Somatic metaphase in root tip cell, in which out of 26 chromosomes, four have secondary constrictions. — Meiosis: Metaphase I. Fig. 13. Regular separation in the hermaphrodite flower. — Anaphase II. Figs. 14, 15. Instances of irregular separation in the male flower. Cytoplasmic droplets are present. In the first case, there is unequal distribution in the dyads into 15-11 and 13-13. In the second case there is a laggard in one of the dyads.

B) Meiosis.

Trifoliata

Jasminum auriculatum Vahl.

$2n = 26$

This diploid did not always behave in a regular manner. Sometimes one or two chromosomes lagged at the equator while dyads were seen to have irregular numbers of chromosomes (Table III), and to carry univalents. Of the 26 chromosomes of the complement, 22 paired and separated regularly, while the remaining four rarely joined up to form quadrivalents (fig. 2) otherwise they would be present as trivalents, bivalents and univalents. Irregularities were due presumably to these four chromosomes. Division was sometimes regular with 13 bivalents visible at side view (fig. 3) or 13 units at polar view of anaphase (fig. 4) followed by a 13-13 separation at telophase.

When the quadrivalent separated at anaphase as two bivalents, dyad numbers were equal but when it separated otherwise the distribution at

the dyad stage would give rise to some variety (figs. 5, 6; Table III). There were observed one to two lagging univalents which could have later formed the basis of the infrequent micronuclei.

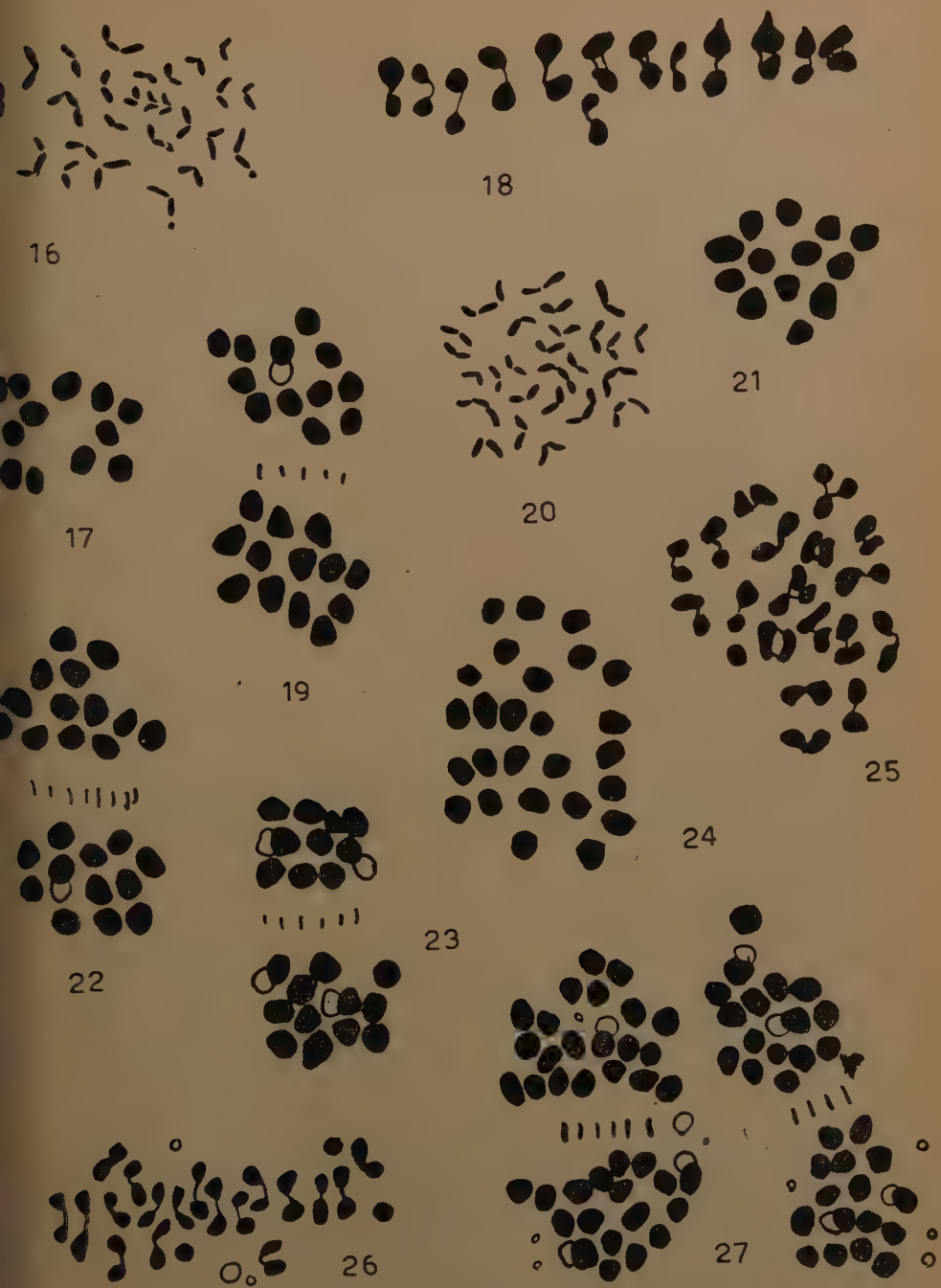
TABLE III

Phase	Configurations	Number of such plates
Diakinesis	13 _{II}	2
»	11 _{II} and 1 _{IV}	2
»	1 _I and 11 _{II} and 1 _{III}	1
»	2 _I and 10 _{II} and 1 _{IV}	1
		<hr/> 6
Metaphase I.	13 _{II}	3
»	2 _I and 12 _{II}	1
		<hr/> 4
Anaphase I.	13 - 13	3
»	13 - 12 and 1 laggard	2
»	12 - 12 and 2 laggards	1
		<hr/> 6
Metaphase II.	13 _I - 13 _I	3
»	11 and 1 _{II} - 11 and 1 _{II}	1
		<hr/> 4
		<hr/> <hr/> 20

Jasminum Sambac Ait., Type I: $2n = 26$. Figs. 16-19 ($\times 3500$). — Fig. 16. Metaphase root tip cell. Three pairs with secondary constrictions can be discerned. — Meiosis: Metaphase I. Figs. 17, 18. Polar and side views, respectively. Separation is regular. Cytoplasmic droplets are almost absent. — Anaphase I. Fig. 19. Late distribution as 13-13.

Jasminum Sambac Ait., Type II: $2n = 26$. Figs. 20-24 ($\times 3500$). — Fig. 20. Somatic metaphase. Of the 26 chromosomes, secondary constrictions are discernible in 6. — Meiosis: Metaphase I. Fig. 21. Polar view of 13 bivalents. — Anaphase I. Fig. 22. An instance of regular separation into 13-13. — Fig. 23. An instance of irregular distribution into 12-14. — Fig. 24. Metaphase, polar view of an unreduced gamete.

Jasminum Sambac Ait., Type III: $2n = 39$. Figs. 25-27 ($\times 3500$). — Meiosis: Metaphase I. Fig. 25. There are 1_I, 16_{II} and 2_{III}. Cytoplasmic drops occur. — Fig. 26. Side view showing 3_I and 18_{II}. — Dyad. Fig. 27. Distribution, which is irregular, is as follows: 18-18 and 20-22.



In a total of 20 plates, 13 plates showed regular behaviour while in the remaining 8 cases, irregular numbers were found (Table IV). The relative frequencies of the presence of uni-, bi-, and trivalents at first metaphase only, in a count of 9 plates may be compared in Table IV.

TABLE IV

N. of Plates	Univalents	Bivalents	Trivalents	Quadrival.	Total
5	0	13	0	0	= 26
1	1	11	1	0	= 26
1	2	12	0	0	= 26
2	0	11	0	1	= 26

There was no case of non-reduction in P.M.C.s. Giant grains (Table V) were less than in other jasmines.

TABLE V

Material	Slides	Total n. pollen grains	% of giant grains	% of normal grains	% of aborted grains
Mature flower	9	2131	0.3	49.9	49.8
Unopened bud	3	6913	0	59.3	40.0
Average size of normal grains, 39.0 μ . Size range in normal grains, 30.2-53.4 μ .					

Some fully formed pollen while in the bud, aborted later on resulting in a 10% decrease of normal pollen in the opened flower.

There were usually 3 lobes to a grain and sometimes 2. The number of germ pores was usually 4 or less frequently 3, 2, and 1. At the tetrad stage, a small extra grain arising from a micronucleus sometimes occurred.

Jasminum calophyllum Wall.

$$2n = 52.$$

Meiotic chromosomes were very small, appearing as mere dots. There were a number of tri- and quadrivalents, with corresponding univalents (figs. 8, 9), somewhat unevenly dispersed at metaphase, but never associating in secondary groups (figs. 10, 11). Bivalents were 18 to 20 in each cell (Table VI), the rest of the 12 to 16 chromosomes combining irregularly. Of these latter, four were homologues, which joined up to form a quadrivalent.

TABLE VI

N. of plates	Univalents	Bivalents	Trivalents	Quadrival.	Total
2	4	19	2	1	= 52
2	2	20	2	1	= 52
1	6	18	3	1	= 52
1	3	18	3	1	= 52
2	7	19	1	1	= 52

The irregularities at anaphasic separation resulted in varying numbers in the dyads (Table VII), this range being narrow, viz. from 24-28.

TABLE VII

N. of plates	Stage of division	Distribution
1	Metaphase II	26 (18 _I and 4 _{II}) - 26 (20 _I and 3 _I)
2	»	26 _{II} - 26 _{II}
3	»	24 _{II} - 28 _{II}

Laggards were not observed. An exceptional case of tetrads undergoing division while inside the mother cell giving rise to «octads» was noted. The was an instance of haploid numbers in the tetrad stage, namely a distribution of 13-13 and 12-14.

More than half of the pollen formed was normal and viable. Germpores varied in number from 4 to 1.

The fact that numbers in dyads did not vary greatly, that the quantity of sloughed off matter was insignificant and that only a low percentage of pollen grains aborted (Table VIII) pointed to a balanced complement despite some irregularities in the meiotic pattern.

Seeds were rarely set, and then not viable.

TABLE VIII

Material	Total pollen	Giant		Normal			Aborted %
		%	Size	%	Size range	Average size	
Mature flower	4562	2.0	85.6 μ	66.2	53.5 μ to 68.4 μ	64.2 μ	31.8

Pinnatifolia

Jasminum grandiflorum Linn. [*J. officinale* var. *grandiflorum* (Linn.) Kobuski].

$2n = 26$.

The spindle figure appeared comparatively small in relation to cell volume. The 26 chromosomes regularly teamed up into 13 bivalents. First anaphase was regular and perfect in the normal form (fig. 13).

Jasminum pubescens Willd., Type I: $2n = 26$. Figs. 28-30 (x 3500). — Meiosis: Diakinesis

Fig. 28. 13 bivalents, of which one is attached to the nucleolus. — Metaphase I

Fig. 29. There are 13 bivalents. There may be cytoplasmic inclusions. — Anaphase

Fig. 30. Regular distribution into 13-13.

Jasminum pubescens Willd., Type II: $2n = 39$. Figs. 31-36 (x 3500). — Fig. 31. Somatic

plate of 39 chromosomes, in which three chromosomes have secondary constrictions.

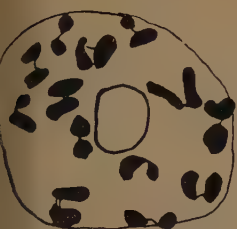
— Meiosis: Metaphase I. Fig. 32. The configurations are $2_{II}17_{III}$. Size difference

between chromosomes are marked. Cytoplasmic droplets are abundant. — Fig. 33.

The configurations are $18_{II}1_{III}$. Quadrivalents are never found. — Fig. 34. There are

$3_{II}15_{III}$. — Anaphase I. Fig. 35. The distribution is 19-20. — Fig. 36. Showing

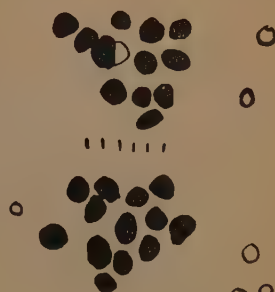
laggard bivalent.



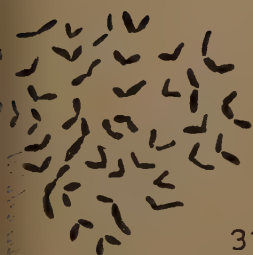
28



29



30



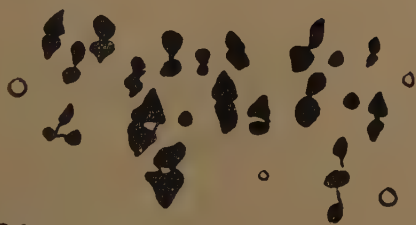
31



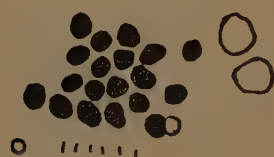
32



33



34



35



36

with slight variations, such as precocity or lagging, in the sport form (figs. 14, 15).

There were sometimes irregularities during division in the perfect flower at second anaphase (Table IX). However, a large proportion of the pollen grains turned out to be infertile.

TABLE IX

N. of plates	Stage of division	Distribution
1	Metaphase I	13
2	Anaphase I	13-13
2	Telophase I	13-13
2	Dyads	13-12 and 1 laggard
2	»	13-12 and 1 precocious
1	Tetrads	13-13, 11-15

Details of morphology and chromosome behaviour have been previously published (DUTT 1950).

Both of the two whorls of the «male» flower had perfect anthers carrying complete pollen. Division of the P.M.C.s. in the androecial whorl of the «male» flower showed some variation from that of the P.M.C. divisions of the normal flower, in being less regular, and accompanied (figs. 14, 15) by an increase in the incidence of cytoplasmic droplets (indicated as hollow spheres), and also (Table X) an increase in aborted pollen.

Pollen grains were markedly larger than those of other species. Giant pollen were not formed in the hermaphrodite flower. The proportion of good pollen decreased in succession from the androecium of the perfect flower to the regular androecial whorl of the male flower and then to the abnormal androecial whorl of the male flower.

There was an interesting size difference in the nature of pollen of the 2 whorls of the male flower, the androecial whorl having larger pollen. The pollen in the perfect flower meanwhile was on the average larger by 53.0 μ .

Pollen grains were usually not lobed and germ pores were one or rarely two.

The pollen of *Pinnatifolia* appeared to be distinct in character from that of the other two groups.

TABLE X

	Total pollen	Giant %	Normal %	Abnormal %
Hermaphrodite: normal whorl	229	0	86.9	13.1
Male: normal whorl	354	0	6.2	93.8
Male: abnormal whorl	990	0.1	14.5	85.3
Size of pollen				
	Normal size range (μ)	Common size (μ)	Average size (μ)	
Hermaphrodite: normal whorl	247.8-177.0	194.7	217.7	
Male: normal whorl	171.9-108.0	141.6	146.1	
Male: abnormal whorl	159.3-123.9	141.6	139.8	
Average size of giant pollen				
Male: abnormal whorl	202.4 μ			

nifoliata
jasminum Sambac Ait.

$2n = 26, 39.$

The division of P.M.C.s in type I followed a regular course (figs. 18, 19, Table XI).

Type II is a diploid in which about 25% of the total number of divisions are irregular (Table XI). A case was noted of doubling of the entire complement, with 26 chromosomes at metaphase (fig. 24). There was also one case of a 14-12 distribution in the dyads (fig. 23). The majority of pollen grains were abortive (Table XII).

Type III showed irregular division with the formation of univalents. The trivalent (fig. 25, Table XI) may separate as 2-1 at anaphase, irregular numbers in dyads and tetrads (fig. 27). The total quantity of pollen produced by type I is greater than in type II (Table XII).

23% of pollen aborted in type I and almost 70% in type II. The average size of pollen of type II were larger by 8 μ in size than those of type I.

TABLE XI

Type	Stage of division	Distribution	N. of plates	% of regular plates	% of irregular plates
I	Metaphase I	13 _{II}	6	100	0
I	Anaphase I	13 - 13	6		
I	Dyads	13 - 13	2		
II	Metaphase I	13 _{II}	6	75	25
II	Metaphase I	12 _{II} 2 _I	1		
II	Anaphase I	13 - 13	1		
II	Dyads	13 - 13	5		
II	Dyads	14 - 12	1		
II	Metaphase	26 _{II}	2		
III	Metaphase I	2 _I 17 _{II} 1 _{III}	1	0	100
III	Metaphase I	4 _I 16 _{II} 1 _{III}	1		
III	Metaphase I	1 _I 19 _{II}	1		
III	Metaphase I	18 _{II} 3 _I			
III	Dyads	20 _I - 16 _I 1 _{III}			
III	Dyads	14 _I 3 _{II} - 13 _I 3 _{II}	1		
	Tetrads	18 - 18 and 22 - 20	2		

TABLE XII

Material	Total pollen	Giant		Normal			Aborted %
		%	Average size (μ)	%	Average size (μ)	range (μ)	
Type I	2603	0.3	77.9	66.6	40.6	36.2 - 57.9	23.9
Type II	524	1.5	80.1	30.4	48.9	35.4 - 61.9	67.0

Jasminum pubescens Willd.

$$2n = 26, 39.$$

The division sequence in the diploid followed a regular pattern (figs. 28, 29, 30), leading to the formation of fertile pollen. Only a few cytoplasmic droplets appeared (figs. 29, 30), in contrast to conditions obtaining in the triploid.

There was a marked size difference in the chromosomes of the triploid (figs. 32-34). There was always one trivalent, sometimes two, which at anaphase separated as 2-1 or 1-1-1. There were bivalents in the dyads. Bivalents, in addition to univalents, lagged at anaphase (fig. 36). The number of univalents at metaphase varied from 1, 2, 3 to 4 (Table XIII). The number of chromosomes in the dyads varied from 17-21

TABLE XIII

Material	Phase	Configuration	No. of plates	%
<i>J. pubescens</i>				
diploid	Diakinesis	13 _{II}	3	20
»	Metaphase I	13 _{II}	5	33
»	Anaphase I	13 - 13	2	13
»	Dyads	13 - 13	3	20
»	Tetrads	13 - 13 and 13 - 13	2	13
<i>J. pubescens</i>				
triploid	Metaphase I	1 _I 19 _{II}	2	10
»	»	3 _I 15 _{II} 2 _{III}	1	5
»	»	4 _I 16 _{II} 1 _{III}	3	15
»	»	2 _I 17 _{II} 1 _{III}	7	35
»	»	18 _{II} 1 _{III}		5
»	Anaphase I	18 _I - 19 _I and 1 laggard	1	15
»	»	18 _I - 17 _I 2 _{II}	1	5
»	»	19 _I - 16 _I 2 _{II}		5
»	»	9 _I 5 _{II} - 12 _I 3 _{II} and 1	1	5
»	Dyads	14 _I 3 _{II} - 13 _I 3 _{II}	1	5
»	»	14 _I 3 _{II} - 17 _I 1 _{II}	1	5

(figs. 35, 36, Table XIII). Some bivalents appeared to be unequal (figs. 32, 33, 34).

The triploid *J. pubescens* showed the most marked formation of droplets in the cytoplasm (Figs. 32, 35, 36). The discarded matter accumulated as large drops, or otherwise was dispersed as fine stainable matter.

C) Cytoplasmic inclusions.

Drops of matter appearing during meiosis in the cytoplasm, were comparable to that reported in *Gladiolus* (MENSINKAI 1940) and *Pisum* (HAKANSSON and LEVAN 1942, SPARROW and HAMMOND 1947). While MENSINKAI as well as HAKANSSON and LEVAN found that with SEMMENS and BHADURI's (1939) technique the bodies were Feulgen negative and Light Green positive, SPARROW and HAMMOND on the other hand found them to be Feulgen positive. Present studies showed that in *Jasminum* they were Feulgen as well as Light Green negative. In *Jasminum* these bodies stain deeply with Crystal Violet. The production of this matter was related to the nature of the meiotic process, being produced in greater quantities when the division cycle did not proceed smoothly and being more abundant in diseased than in healthy plants. It occurred in progressively larger quantities in the species arranged as follows — *J. Sambac*, *J. auriculatum*, *J. grandiflorum*, *J. calophyllum*, *J. pubescens*, and in the latter case so greatly produced that it often masked the chromosomes. The diploid produced it in lesser quantity than the triploid form. Their origin was explained by SPARROW and HAMMOND as being due to an upset in the nucleic acid cycle of the cytoplasm and the nucleus, leading to a sloughing off of extra matter. In *Jasminum* such bodies appeared in the nucleoplasm at prophase within the nuclear membrane and often when the membrane dissolved, persisted through division, passing by cytokinesis to the dyads and then to the tetrads. At first metaphase and anaphase they remained near the spindle apparatus. Some tests conducted to determine their nature, are mentioned in brief.

Fat. They did not reduce osmium tetroxide and were not dissolved in warm alcoholic H_2O_2 .

Starch. The iodine test was negative and they were not destroyed after prolonged hydrolysis in N.HCl.

Nucleic acids. 1) They stained neither magenta nor green with SEMMENS and BHADURI's technique although chromosomes and nucleoli

tained as usual. 2) With Pyronin and Methyl Green the bodies did not stain whereas chromosomes and nucleoli stained normally. 3) SHARMA and BHATTACHARYA's (1952) schedule to disintegrate nucleoproteins was carried out and although when later stained with Crystal Violet, chromosomes and nuclei were found to have disappeared, the bodies still took the stain. 4) With RATTENBURY's (1952) technique for demonstrating nuclei, these bodies remained invisible. Further tests have to be carried out to determine as to whether or not they may be some kind of protein.

II. POLLEN ANALYSIS

Pollen grains were obtained from freshly opened flowers, unopened flowers in bud and dried herbarium sheets. Those which appeared misshapen, twisted or empty, were classed as «aborted» grains, the rest considered «normal» and therefore viable. Giant grains occurred frequently and were almost double the size of the others. Such points as number of lobes, number of germ pores and size of pollen grains were noted.

TABLE XIV

Group and species	Normal pollen			Giant pollen		Aborted pollen %
	%	Size range (μ)	Average size (μ)	%	Size (μ)	
Trifoliata:						
<i>J. auriculatum</i>	49.9	30.2 - 53.2	39.0	0.3	—	49.8
<i>J. calophyllum</i>	66.2	53.5 - 68.0	64.2	2.0	85.6	31.6
Pinnatifolia:						
I <i>J. grandiflorum</i>	86.9	177.0 - 247.8	217.7	0	—	13.3
II » upper	6.2	108.0 - 171.9	146.1	0	—	13.3
III » lower	14.5	123.9 - 159.3	139.8	0.1	202.4	85.3
Unifoliata:						
<i>J. Sambac</i> I	66.6	36.2 - 57.9	40.6	0.3	77.9	23.9
<i>J. Sambac</i> II						
<i>J. Sambac</i> III						
<i>J. pubescens</i> I	15.1	30.5 - 53.5	48.0	1.8	64.2	82.9
<i>J. pubescens</i> II						

A large percentage of pollen aborted. Among the diploids with apparently a regular disjunction of chromosomes, pollen irregularity amounted to 13.3% in *J. grandiflorum* (type I) and 23.9% in *J. Sambac* (type I). In the sport form of *J. grandiflorum* (type II), there occurred 85.3 to 93.8% aborted pollen. There was a difference in fertility between the two whorls namely one being of the androecium proper and the other which abnormally replaced the gynaecium. While the triploid *J. pubescens* produced 82.9% aborted pollen the tetraploid was more balanced, having 31.6% of aborted grains, and which approximates the diploid figure. There were giant pollen in almost all species, being greatest (2%) in *J. calophyllum*. Pinnatifolia pollen attained a large size, the normal pollen (217.7 μ) being considerably larger than the largest giant pollen among the other species, namely the 85.6 μ in the case of *J. calophyllum*. The other two groups, Trifoliata and Unifoliata had about the same size of average diploid pollen. It was interesting to note that there was a progression in pollen size according to ploidy: thus expressed in round figures.

The average size of diploid pollen : 40 μ

The average size of triploid pollen : 50 μ

The average size of tetraploid pollen : 65 μ

DISCUSSION

I. Interrelationships among Jasmines.

Jasmines have a long history of cultivation in India and were well established garden forms in KALIDASA's time (380 A.D.). *Jasminum* is known to have at least 300 sp. out of which many are turning out to be synonyms (RENDLE 1925, KOBUSKI 1932, SAX and ABBÉ 1932, REHDER 1940, TAYLOR 1945), and this is due to the popularity of this genus.

Cytomorphologically, *Jasminum* is sharply cut off from the other groups of the Oleaceae (TAYLOR 1945). When the species included in this study are grouped according to both TAYLOR's key (for Oleaceae) and KOBUSKI's key (for *Jasminum*), these following affinities emerge; *J. auriculatum* and *J. calophyllum* are related to each other, *J. Sambac* and *J. pubescens* may be grouped together whereas *J. grandiflorum* is distinct from them. KOBUSKI makes a basic differentiation between all jasmines as to whether their leaves are opposite or alternate and RAMAN has reaffirmed this differentiation on the basis of cytology. In a case

where phylogenetic links are missing, a study of chromosome behaviour is expected to give some clues as to the interrelationships of an isolated group such as this, «which», (TAYLOR 1945) «is the only known polyploid group of comparable size which has no close relatives with lower numbers». The total length of chromosome complements when considered against the ploidy of the species, shows a regular series in increase in complement length.

total length of diploid complement = 40 μ

total length of triploid complement = 55 μ

total length of tetraploid complement = 70 μ

It may be noted in this context that TROMBETTA (1942) has found that in general, induced polyploids show a direct doubling of cell and nuclear volume to the haploid ratio, whereas in natural polyploids, the enlargement is on a lesser scale.

The jasmines have a high base number which is expected to be a derived one. The forming of secondary groups at metaphase is considered a valuable clue in determining what such lower numbers might have been (DATTA 1954). In the jasmines, secondary association, though expected, could not be observed. RAMAN as well as SHARMA and SHARMA mention a few instances of unspecified grouping, on the other hand TAYLOR finds an absence of it for the whole of the Oleaceae. SAX and ABBÉ (1932) regarded $x = 12$ as the base number for *Jasminum* and TAYLOR (1945) reports a case of $2n = 24$. One instance of $11u$ and $1v$ was found in *J. auriculatum* (fig. 2). In the karyotype of *J. auriculatum* SHARMA and SHARMA find several chromosomes of the same type in the set. As to whether among these there are 4 homologues or not can be known only when more details, including the length of each individual chromosome, are made known.

On the basis of pollen morphology the representative of Pinnatifolia viz. *J. grandiflorum*, is sharply differentiated from the other groups (Appendix II) in being distinct as regards size of grains as well as the number of germ pores.

II. The somatic complement.

The *Jasminum* complement has undergone structural changes through the ages. In addition to the evidence adduced by SHARMA and SHARMA, instances of a maximum of 9 nucleoli noticed in tetrads of *J. Sambac* type II support this contention in accordance with previous

APPENDIX I
Comparative data of species arranged according to ploidy.

Species	Flowers	Fruit	Pollen			Total of length of somatic complement (μ)	Meiosis	
			Normal %	Giant	Aborted %		Regular %	Irregular %
<i>2n</i> <i>J. auriculatum</i>	Abundant, normal.	Many	49.9	0.3	49.8	40.4	60	40
<i>J. officinale</i> var. <i>grandifl.</i> I	Normal, not profuse.	Few	86.9	0	13.1	—	100	0
<i>J. officinale</i> var. <i>grandifl.</i> II	Abnormal, not profuse.	Absent	10.3	0	89.5	38.4	75	25
<i>J. Sandoz</i> I	Abundant, some aberrations found.	Rare	66.6	0.3	23.9	38.2	100	0
<i>J. Sandoz</i> II	do-	Rare	30.4	1.5	67.0	37.4	75	25
<i>J. pubescens</i> II	Abundant, normal.	Many	—	—	—	—	100	0
<i>3n</i> <i>J. Sandoz</i> III	Normal, not abundant.	—	—	—	—	—	0	100
<i>J. pubescens</i> I	Abundant, aberrations found.	Absent	15.1	1.8	82.9	54.7	0	100
<i>4n</i> <i>J. calophyllum</i>	Not profuse, aberrations many.	Rare	52.1	2.2	47.6	69.9	0	100

Species	2n	Habit	Ovules in each loculus	Calyx lobes	Leaves	Pollen size (μ)		Droplets in cytoplasm
						Normal	Giant	
TRIFOLIATA								
<i>J. auriculatum</i>	26	Woody twiner	2	Minute	Compound, dark green	39.0	74.1	Present, not abundant
<i>J. calophyllum</i>	52	Woody twiner	2	Minute	Compound, yellowish green	64.2	85.6	Rarely present
PINNATIFOLIA								
<i>J. officinale</i> var. <i>grandiflorum</i> I	26	Woody or twiner or large bush	2	Long	Compound, yellowish green, glabrous	217.7	0	Present, very rare
<i>J. officinale</i> var. <i>grandiflorum</i> II	26	-do-	2	Long	-do-	143.0	202.4	Present, not very rare
UNIFOLIATA								
<i>J. Sambac</i> I	26	Woody twiner or small bush	1	Long	Simple, thin, yellowish green	40.6	77.9	Sometimes present
<i>J. Sambac</i> II	26	Small woody bush	1	Long	-do-	48.9	80.1	-do-
<i>J. Sambac</i> III	39	Woody twiner or small bush	1	Long	-do-	—	—	-do-
<i>J. pubescens</i> I	39	Woody twiner or large bush	1	Long	Simple, not thin, pubescent	48.0	64.2	Abundantly present
<i>J. pubescens</i> II	26	-do-	1	Long	-do-	—	—	Always present, but less than above

reports (JACOB 1940, BHADURI 1944, CHAKRAVARTI 1951). Rearrangements, translocations and eliminations have possibly continued for a long length of time, till a balance has been struck between mean size of chromosome and the total length of complement and also between total chromatin volume and size of cell, but this has evidently progressed at the expense of homogygosity of the chromosome pairs. This is evident in the almost uniform chromosome size, as well as of instances of there being a single chromosome in the complement without its homologue (SHARMA and SHARMA), and also in loss of secondary attraction. Such types have survived by recourse to vegetative propagation, despite mitotic and meiotic irregularities.

III. *The course of meiosis.*

Irregular meiosis leads to defective pollen and egg cells, which in the end accounts for the sterility of the genus. Some observable discrepancies in the meiotic mechanism have been mentioned. In some cases structural changes have possibly led to loss of genes as expressed in the total suppression of the female sex in the sport form of *J. grandiflorum* complemented by an overproduction of anthers and pollen. Idiogram studies (SHARMA and SHARMA) give a clue as to the erratic behaviour of diploid sets which may contain irregular numbers of homologues or carry chromosomes which are almost homologues.

Mitosis and meiosis can often proceed regularly but there are cases of their breakdown and of the formation of daughter cells with irregular numbers during both processes. This is a situation, which in Jensen's (1938) terminology is «almost regular». Homology in the somatic complement appears to have been achieved chiefly by structural rearrangements and is possibly sufficient for continuance of the mechanics of mitosis and also as in some diploids, of meiosis. But the deficiency becomes manifest when pollen is to be formed and a large number of grains fail to develop. Furthermore, functionally, many of the «normal» appearing grains are sterile and the same picture possibly also applies as regards the egg mechanism.

IV. *Polyploidy in Jasminum.*

In his studies on the phylogeny of the Oleaceae, TAYLOR has been led to conclude that polyploidy has played a minor part in the formation of the genera of Oleaceae and has been negligible in species formation and this appears to be particularly true with regard to the jasmines.

They are found to be secondary forms but not secondarily balanced forms. They are hybrids of both the allo and auto variety but in their case hybridism has not been followed by amphidiploidy and the types have survived by recourse to vegetative propagation. But for the most part they are structural hybrids (SHARMA and SHARMA). Structural changes may have taken place both before and after hybrid crossing and has helped to give rise to the innumerable varieties and subvarieties (BHATNAGAR 1956) in which the more popular cultivated types abound.

In the diploids, meiosis could be either regular or not, irregularities being manifest variously as :

- 1) chromosomes which do or do not pair
- 2) precocity
- 3) lagging during the anaphase movement.

These seem to denote a slight measure of heterogosity in the complement. Diploids with quite regular division produce at least 13% abortive pollen while those in which discrepancies occur have about 60% bad pollen.

The triploid *J. pubescens* having vegetative and floral parts of a larger size than the diploid but not differing in morphological detail and having trivalents in the complement is considered an autotriploid, similar to the one reported in *J. Sambac* by RAMAN.

A case of non reduction was noticed in *J. Sambac* and RAMAN also records an instance. The triploids in this species may have arisen by $2n + 1n$ fusion of similar and related types. In all the instances so far recorded and summarized below in *J. Sambac*, no polyploids other than triploids have been noted, thus :

J. Sambac Aiton

Author	diploids	triploids	total no. of sp. observed
BOWDEN (1940)	1	nil	1
TAYLOR (1945)	nil	1	1
KRISHNASWAMY and RAMAN (1948, 49)	3	1	4
DUTT (1952)	2	1	3
SHARMA and SHARMA (1958)	5	1	6

The karyology of the tetraploid *J. calophyllum* was determined by SHARMA and SHARMA but no interpretation was attempted. On the basis of behaviour it may be considered as having both auto and allo characters, the difference of both conditions being one of degree, in common with MUNTZING's (1936) findings.

Thus though the number of polyploid jasmines is by no means small triploidy takes place frequently and tetraploidy in a few known instances but higher polyploids are not formed (DARLINGTON and WYLIE, 1955). The percentage of abortive pollen ranges from 13 in the diploids to 75 in the polyploids (Appendix I). RAMAN (1955c) has apparently overlooked the giant pollen grains, since he does not mention them. Present measurements could not be compared to his as he omitted to furnish the values for his micrometer readings, but when known the readings will very likely turn out to be similar. In the case of *J. grandiflorum*, evidence of a polyploid origin was restricted to pollen grain size which was markedly larger than in the other diploids, as similar to other known instances (SAX 1933, WILSON 1948).

Diploids with regular meiosis produced 65% good pollen, the tetraploid had 50% of good pollen, the diploids with irregular meiosis appeared to have 30% good pollen while the figure for triploids was lower. (Appendix I). Thus pollen abnormality could be related to meiotic irregularities, but the proportion of bad pollen slightly exceeded that of irregular meiosis. Germ pore counts could be correlated to KOBUSKI's grouping, thus:

<i>Trifoliata</i>	<i>Pinnatifolia</i>	<i>Unifoliata</i>
($2n = 26, 52$)	($2n = 26$)	($2n = 26, 39$)
germ pores = 1 to 4	germ pore 1, rarely 2	germ pores = 2 or 3

Thus there were many indications that the diploid jasmines have a derived set, among these being large number of nucleoli, sloughing off of protoplasmic matter at meiosis, a slight lack of homozygosity in the complement, the large quantities of nonviable pollen, the many germ pores and also the gigas characters in pollen.

Lack of secondary association can be attributed to the continuous process of structural changes, including alternations, additions and eliminations, and which has been determined by SHARMA and SHARMA to have played a prominent part in the speciation of the genus. To this process of structural changes can be attributed the uniformity in size, size range and nuclear and cell volume relationships of present day

jasmynes which can be considered to have been retained at the risk of homozygosity. Although SAX and ABBE (1932) mention that the fruit and seeds of malayan jasmynes may be eaten and distributed by birds, and RAMAN (1955c) finds that normal fruit production is hampered by the picking of flowers buds, present observations indicate that though the jasmynes flower profusely, fruit are rarely set, and those few which are produced at the end of the flowering period usually have non-functional seeds. The following contributory factors are noted :

- 1) The entire flower may dry up and drop away after fertilization.
- 2) In an apparently well formed bud, the androecium may have withered away.
- 3) The fertilized ovary after developing for 2 or 3 days, drops away.
- 4) The entire flowering branch may dry up.
- 5) In some fruits only the outer husk of the seed may be developed without the embryo inside.
- 6) Garden forms may be virus ridden leading to formation of misshapen or coalesced buds.

The cultivated jasmynes of today represent a living race of in some measure unstable complements, perpetuated by vegetative means. Most forms are self as well as cross sterile and as regards possibilities of further speciation by hybridization generally a dead end has been reached. A possible method of speciation by vegetative means has been pointed out SHARMA and SHARMA, although it is not known as to whether present day jasmynes can engage in further speciation. Present day garden jasmynes may possibly have reached the end of their evolution, having survived through the ages chiefly by association with man.

SUMMARY

1) *Jasminum* is composed of a well evolved and distinct group of plants. In spite of this popular form existing in innumerable varieties in the tropic and temperate belts, the flower character is constant and a jasmine is immediately recognizable as one.

2) The 9 varieties and types included in the present study were collected from various geographical regions of India. They are ornamental, vegetatively propagated forms. All of them conform to $x = 13$.

There are 6 diploids, 2 triploids and 1 tetraploid among them. Higher polyploidy is apparently unknown in the jasmines.

3) Mitotic data conform generally to a recent publication and have been in the main, excluded. Meiotic behaviour worked out in some detail does not, in general, confirm previous reports that the course is regular. The relevant data are presented.

4) Somatic chromosomes are small in size and the size range is not great confirming earlier observations. The average total lengths of the complements of diploid, triploid and tetraploid varieties, when reduced to round figures shows correlation between increase in the total length and the ploidy of the species, which is less than once the haploid length, thus :

total length of diploid complement	= 40 μ
total length of triploid complement	= 55 μ
total length of tetraploid complement	= 70 μ

5) Pollen abnormality increases in proportion, but in a greater degree, to meiotic abnormality in the pollen mother cells.

6) Diploids have a regular or almost regular division. Those with a regular sequence produce at least 13% of abortive pollen, in comparison to others which produce a greater quantity of non-viable pollen. In proportion to the latter, the number of seeds set is however negligible in quantity. The triploids are sterile and the tetraploid almost so.

7) Present observations support the view that though polyploidy has played a part in the earlier origins of family and genera it has not been the main factor in speciation. Jasmines are sterile by nature and are not balanced hybrids. One of the factors contributing to this condition is that somatic chromosomes in the complements are often not completely homozygous and the other is that the complement has sustained loss of genes. This condition can have been achieved either by crosses between gametes reduced or unreduced, of nearly related sets and not followed by doubling, or by means of structural changes, or by both.

8) Natural polyploidy is confined to triploidy and tetraploidy, the former being more common.

9) Evidence pointing to lower numbers is rare, there being virtual absence of secondary association, but rarely instances of $x = 12$ was met with in *J. auriculatum*.

10) To sum up, the cultivated jasmines are ornamental forms that have reached the end of legitimate speciation. They are sterile variants of originally fertile forms. Genetically unbalanced clones have been preserved by vegetative cultivation, as not only are the polyploids sterile but also the diploids. In their distinct and isolated phylogeny, the jasmines reflect the nature of the Oleaceae family, which is distinguished by similar traits.

ACKNOWLEDGEMENTS

I have to acknowledge my indebtedness to (the late) Prof. P. C. Sarbadhikari, Head of the Department of Botany, Calcutta University as well as to Dr. D. M. Bose, Director, Bose Institute, Calcutta, for affording me laboratory facilities. Thanks are due to Dr. P. N. Bhaduri, now Head of the Department of Botany, Presidency College, Calcutta, for some helpful discussions.

REFERENCES

- BHADURI P. N., 1944. — *Chromosome nucleolus relationship and its bearing on cytogenetical interpretation*. J. Roy. Micr. Soc., **63**: 91-120.
- BHATNAGAR G. S., 1956. — *Studies on the biology of Jasminum Sambac (proper)*. Sci. and Cult., **21**: 613-615.
- BOWDEN W. M., 1940. — *Diploidy, polyploidy and winter hardiness relationships in the flowering plants*. Am. Journ. Bot., **27**: 357-371.
- CHAKRAVARTI A. K., 1951. — *Origin of cultivated bananas of South East Asia*. Ind. J. Genet. and Plant Breeding, **1**: 34-46.
- DARLINGTON C. D. and WYLIE A. P., 1955. — *Chromosome Atlas of Flowering Plants*. London.
- DATTA M., 1954. — *Cytogenetical studies in 2 species of Morus*. Cytologia, **19**: 86-95.
- DUTT M., 1950. — *Carpel metamorphosis in Jasminum grandiflorum Linn.* Bull. Bot. Soc. Bengal, **4**: 95-103.
- , 1952a. — *Mercuric chloride as chromosome fixative for oily material*. Stain Technol. **27**: 121-122.
- , 1952b. — *Chromosome numbers in some ornamental jasmines*. Sci. and Cult., **17**: 527-528.
- HAKANSSON A. and LEVAN A., 1942. — *Nucleolar conditions in Pisum*. Hereditas, **28**: 436-440.
- HOOKE J. D., 1894. — *Flora of British India*. London, **3**: 590-602; **5**: 491.

- HUTCHINSON J., 1926. — *The families of flowering plants*. Macmillan and Co. Ltd., London.
- JACOB K. T., 1940. — *Chromosome numbers and the relationship between satellites and nucleoli in Cassia and certain other Leguminosae*. Ann. Bot., n. s., **4**: 201-226.
- JENSEN H. W., 1938-1939. — *On plants with almost regular meiosis*. Cytologia, **9**: 412-418.
- KOBUSKI C. E., 1932. — *Synopsis of the Chinese species of Jasminum*. J. Arn. Arb., **13**: 145-179.
- KRISHNASWAMY N. and RAMAN V. S., 1948. — *Cytogenetical study of the Indian jasmines. I. Taxonomy and chromosome numbers of 4 varieties of J. Sambac and other species*. J. Ind. Bot. Soc., **27**: 77-83.
- MENSINKAI S. W., 1940. — *Cytological studies in the genus Gladiolus*. Cytologia, **10**: 59-71.
- MÜNTZING A., 1936. — *The evolutionary significance of autopolyploidy*. Hereditas, **21**: 263-378.
- PRAIN D., 1903. — *Bengal Plants*. **2**: 955.
- RAMAN V. S., 1955a. — *Cytogenetics of the Indian jasmines. I. Morphological and taxonomical*. Bot. Mag. Tokyo, **68**: 253-261.
- , 1955b. — *Cytogenetics of the Indian jasmines. II. The somatic chromosomes*. Cytologia, **2**: 19-31.
- , 1955c. — *Cytogenetics of the Indian jasmines. III. Meiosis*. Cytologia, **20**: 133-147.
- RATTENBURY J. A., 1952. — *Specific staining of nucleolar substances with acetocarmine*. Stain Tech., **27**: 113-120.
- REHDER A., 1940. — *Manual of cultivated trees and shrubs*. New York.
- RENDEL A. B., 1925. — *The classification of flowering plants*. Cambridge.
- ROXBURGH W., 1874. — *Flora Indica*. London, **30**: 658.
- SAX K., 1933. — *Chromosome numbers in Ulmus and related genera*. J. Arn. Arb., **14**: 82-84.
- SAX K. and ABBÉ E. C., 1932. — *Chromosome numbers and the anatomy of the secondary xylem in the Oleaceae*. J. Arn. Arb., **13**: 37-48.
- SEMMENS C. S. and BHADURI P. N., 1939. — *A technic for differential staining of nucleoli and chromosomes*. Stain Technol., **14**: 1-5.
- SHARMA A. K. and BHATTACHARYA D., 1952. — *Effect of trichloroacetic acid on nuclear proteins*. Nature, **169**: 417-418.
- SHARMA A. K. and SHARMA A., 1958. — *Analysis of chromosome morphology and possible means of speciation in Jasminum*. Cytologia, **23**: 172-185.
- SPARROW A. H. and HAMMOND M., 1947. — *Cytological evidence for the transfer of desoxyribonucleic acid from nucleus to cytoplasm in certain plants*. Am. J. Bot., **34**: 439-445.
- TAYLOR H., 1945. — *Cytotaxonomy and phylogeny of the Oleaceae*. Brittonia, **5**: 337-367.
- TROMBETTA V. V., 1942. — *The cytonuclear ratio*. Bot. Rev., **8**: 317-336.
- WILSON G. B., 1948. — *Nucleolar and cell volume in a polyploid series of the Musae*. J. Genet., **49**: 42-45.









E



F

EXPLANATION OF PLATES LXXV-LXXVII

PLATE LXXV

- A. *Jasminum auriculatum* Vahl. (Collected - Calcutta).
B. *Jasminum calophyllum* Ait. (Collected - Calcutta).

PLATE LXXVI

- C. *Jasminum Sambac* Ait. type 1. (Collected - Calcutta).
D. *Jasminum Sambac* Ait. type 2. (Collected - Calcutta).

PLATE LXXVII

- E. *Jasminum Sambac* Ait. type 3. (Collected - Rambha).
F. *Jasminum pubescens* Willd. (triploid) type 2. (Collected - Calcutta).

RIASSUNTO

Jasminum è costituito da un distinto e ben evoluto gruppo di piante, e nonostante la sua diffusione in innumerevoli varietà nelle regioni temperate e tropicali i suoi caratteri florali sono costanti e permettono l'immediato riconoscimento di un gelsomino. Le nove varietà o tipi studiati dall'Autore furono raccolti in diverse regioni geografiche dell'India. Si tratta di forme ornamentali, a propagazione vegetativa. Esse presentano tutte il numero base dei cromosomi $x = 13$. Di esse sei sono diploidi, due triploidi e una tetraploide. Livelli più alti di poliploidia sembrano sconosciuti nei gelsomini. I dati delle mitosi sono conformi generalmente a quelli di una recente pubblicazione e sono stati in generale esclusi dal presente studio. È stato invece approfondito il comportamento meiotico, e il suo studio in generale non conferma i precedenti reperti di un decorso regolare. I cromosomi somatici sono di piccole dimensioni. La lunghezza totale media del corredo cromosomico, quando sia ridotto a numeri interi, mostra una correlazione fra l'aumento della lunghezza totale e la ploidia della specie, con una leggera diminuzione rispetto alla lunghezza del corredo aploide; cioè che la lunghezza totale del corredo diploide è 40 μ , quella del triploide è 55 μ , quella del tetraploide 70 μ . Le anomalie del polline aumentano in proporzione, ma in un grado più alto delle anomalie meiotiche, nelle cellule madri del polline. I diploidi presentano una divisione regolare o pressoché regolare. Quelli con una successione regolare di stadi producono circa il 13% di polline abortivo, mentre gli altri producono una più grande quantità di polline non vitale. In confronto al polline, il numero dei semi è in quantità pressoché trascurabile. I triploidi sono sterili, anche i tetraploidi lo sono pressoché del tutto.

Le osservazioni effettuate durante la presente ricerca confermano che, per quanto la poliploidia abbia avuto una parte importante nella prima origine della famiglia e dei generi, essa non è stata il fattore principale della speciazione. I gelsomini sono sterili per natura e non sono ibridi bilanciati. Uno dei fattori che contribuisce a determinare questa condizione è che i cromosomi somatici dei corredi non sono completamente omozigoti, che il corredo ha subito perdita di gene. Questa condizione può essere stata raggiunta o per incrocio fra gameti ridotti e non ridotti di ceppi affini non seguito da duplicazione, o per mezzo di cambiamenti strutturali, o per mezzo di ambedue i processi. La poliploidia naturale è limitata alla triploidia e alla tetraploidia, questa ultima essendo la meno comune. L'esistenza di numeri cromosomici più bassi è rara essendoci una virtuale assenza di associazione secondaria, ma qualche caso di $x = 12$ è stato osservato per quanto raramente in *Jasminum auriculatum*. Concludendo i gelsomini coltivati sono forme ornamentali che hanno raggiunto il termine del processo di speciazione. Essi sono varietà sterili di forme originariamente fertili. Cloni geneticamente sbilanciati sono stati preservati dalla propagazione vegetativa non soltanto come poliploidi sterili ma anche come diploidi. Nella loro filogenesi distinta e isolata i gelsomini riflettono la natura della famiglia delle Oleaceae, che si distingue per simili caratteristiche.

ENRICO MESSERI

**CONSIDERAZIONI GEOGRAFICHE
SULLA SENSIBILITÀ AL TEST PTC IN SOMALIA**

(con 1 figura nel testo) *

In Redazione: il 10 Febbraio 1960.

È ormai ben noto ai biologi e in particolare ai genetisti il valore del « test PTC » (feniltiocarbamide 0,05%) atto a differenziare nelle popolazioni due categorie di persone: sensibili o insensibili alla sostanza. Tale differenziazione corrisponde a una sostanziale diversità di funzione, e forse anche di struttura, dell'organo del gusto nelle sue organizzazioni periferiche e centrali ed è legata a una eredità del carattere indipendente dall'ambiente, dal sesso e dall'età. Di questo argomento ci siamo interessati sia sul piano strettamente genetico come su quello patogeno e etnico (MESSERI 1959) e pertanto rimandiamo il lettore a quelle pubblicazioni e alla monografia del MENEGHETTI (1954). Nella presente nota illustriamo il comportamento del fenomeno presso alcune tribù della Somalia centrale e meridionale, insediate fra l'Uebi e il Giuba e nell'Oltre-Giuba, visitate di recente da una missione scientifica della nostra Università, inviata per la raccolta di dati botanici, zoologici e antropologici della regione, e delle quali già abbiamo riferito sui gruppi sanguigni, sul colore degli occhi, e sulla morfologia auricolare. Dopo l'analisi dei dati sperimentali faremo dei raffronti con i reperti raccolti in molte nazioni e con quelli di recente descritti da noi in Italia.

Per quanto riguarda le notizie etnologiche e geografiche delle tribù saggiate col test PTC (dal Dr. Moggi e dal Sig. Bavazzano, componenti della suddetta missione scientifica) rimandiamo a quanto è stato accennato a proposito dei gruppi sanguigni di quelle popolazioni (MESSERI 1960).

* Lavoro eseguito nell'Istituto di Fisiologia Generale dell'Università di Messina.

Pubblicato con un contributo del C.N.R.

I saggi genetici, con la tecnica da noi impiegata in Italia (FORD 1948), sono stati sperimentati su 306 soggetti indigeni di ambo i sessi (M = 208, F = 98). Sono risultati sensibili (PTC +) 167 somali pari al 54,56%, ed insensibili 139, pari al 45,44% del collettivo.

Considerando separatamente i due sessi si nota che i sensibili maschi (PTC + M) sono 112, pari al 53,7% di questo sesso, e le femmine sensibili (PTC + F) 55, pari al 55%. Gli insensibili sono (PTC — M) 96, pari al 46,3% e le insensibili (PTC — F) 43, pari al 45%.

Osservando la tabella I si nota che la omozigosi recessiva del carattere (PTC —) è più frequente nel maschio (con un lieve scarto del 1,3%) che nella femmina, e che la sensibilità è meno frequente nel maschio (con lo stesso scarto) che nella femmina.

TABELLA I

PTC+ = 167	PTC— = 139	PTC+ = 54,56%	PTC— = 45,44%
PTC+ M = 112	PTC+ F = 55	PTC+ M = 53,7 %	PTC+ F = 55 %
PTC— M = 96	PTC— F = 43	PTC— M = 46,3 %	PTC— F = 45 %
M = 208 = 67,97%		Frequenza genica PTC — = 0,66	
F = 98 = 32,03%			

Tali sono le stigmate caratteristiche rivelate dal test PTC nelle tribù somale sperimentate. Se facciamo ora un raffronto con le frequenze sperimentate in Italia per lo stesso carattere, notiamo che i dati su esposti si accostano molto a quelli già da noi trovati in Campania (PTC — = 43,7%), mentre la media italiana è di PTC — = 36,6%.

Volendo poi allargare la comparazione con i dati pubblicati dal MONTAGÙ (1951) si nota che i somali esorbitano dai dati riportati dall'Autore che vanno dal 58,7% di PTC + nel Galles al 98,2% nel Nuovo Messico. Se si allineano in ordinazione progressiva di valori i vari popoli per ora saggiati col test PTC si trovano per primi i Somali con un valore PTC + = 54,56% seguono i Gallesi (58,7%), gli Esquimesi (59,2%), Tedeschi (62,3%), Danesi (62,8%), Russi (63,2%), Italiani (media regionale 63,4%), Siriani (63,5%), gli americani del Montana (64,6%), Palestinesi (67,7%), Armeni (68%), Ebrei palestinesi (68,5%),

Svizzeri (70,4%), Scozzesi (71,7%), Irlandesi (71,8%), Egiziani copti (73,6%), Inglese (73,7%), Baschi (74,5%), Negri americani (76,5%), Cinesi formosani (89,5%), Indiani del Montana (90,0%) Negri africani

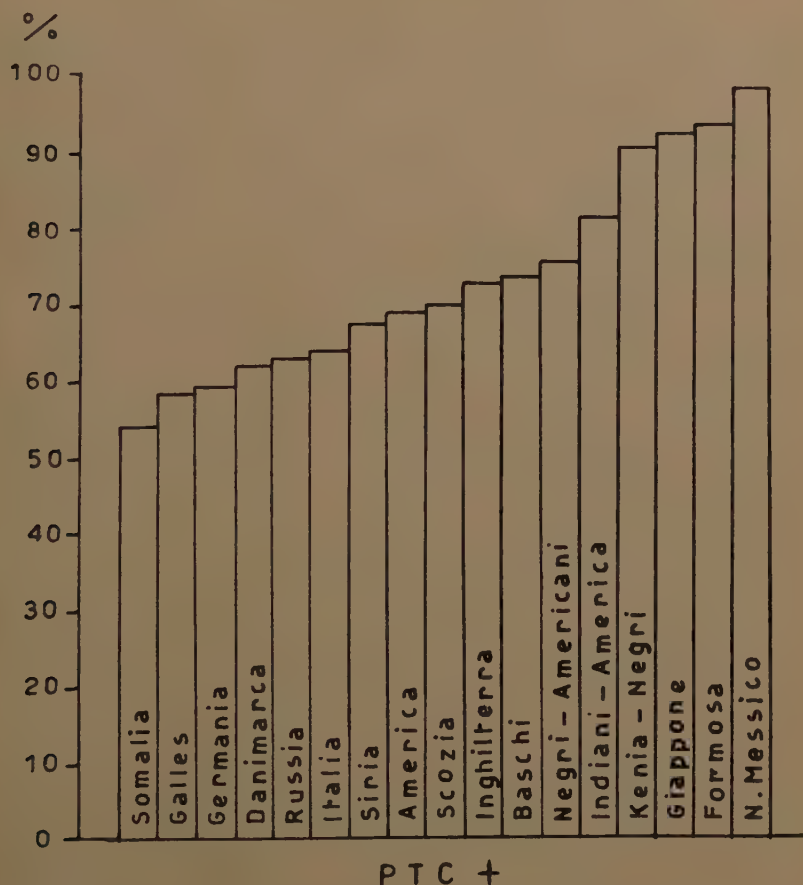


Fig. 1 — Frequenza dei sensibili alla PTC, in ordine crescente, fra i vari popoli saggiati.

del Kenia (91,9%), Giapponesi (92,9%), Cinesi (94,0%), Sudanesi (95,8%), Amerindiani del Nuovo Messico (98,2%) (Fig. 1).

Come si nota da questo elenco di frequenza del fenomeno PTC+ nel mondo, le tribù somale da noi studiate differiscono molto da tutti i dati suriferiti e in particolare dalle razze già saggiate che più si avvi-

cinano alla composizione del mosaico etnico somalo, come i negri del Kenia (91,9%), i copti egiziani (73,6%) e i maomettani sudanesi (95,8%). Mentre si avvicinano relativamente agli Inglesi del Galles (58,2%), agli Esquimesi del Labrador (59,2%), ai Tedeschi (62,3%) e anche agli Italiani (63,4%). È evidente che questo carattere eminentemente ereditario non segue una norma geografica, nel senso di una particolare distribuzione spaziale nei vari continenti, nè una norma latitudinaria come abbiamo potuto mettere bene in evidenza invece a proposito del colore delle iridi, nè una etnica, in relazione cioè col grado di affinità delle varie popolazioni fra loro, ma verosimilmente risente della vis selettiva operata dall'ambiente, soprattutto nel campo della alimentazione. Già abbiamo trattato questo interessante argomento a proposito sia della correlazione del fenomeno col diabete mellito, sia nella recente inchiesta regionale italiana (MESSERI 1958, 1959, 1960). È da notare che il carattere sensibilità alla PTC, considerato acquisito dall'umanità fin dai tempi più remoti da un comune antenato con gli antropoidi (FORD 1948; FISCHER 1938) ha dimostrato una eccezionale perseveranza, per oltre un milione di anni (MONTAGÙ 1951), e ciò in virtù di una supposta condizione vantaggiosa del genotipo eterozigote rispetto a quello omozigote, sia dominante che recessivo (PTC—). Ciò favorirebbe le combinazioni geniche impure tendenti a conservare la prevalenza di una distribuzione genotipica in equilibrio, quale potrebbe essere un quarto di omozigote dominante, un mezzo di eterozigote e un quarto di omozigote recessivo (PTC—). Su questo equilibrio genico teorico gli elementi della selezione sociale non hanno verosimilmente alcuna importanza, mentre molta ne debbono avere i fattori della selezione naturale che possono operare su materiale genico già preparato dalle mutazioni e dai « drifts » (EIKSTEDT 1934). Data la nostra conoscenza su esempi di correlazioni che rispecchiano da vicino un adattamento ecologico che si è andato selezionando e potenziando nel tempo, come si osserva a proposito del colore degli occhi con l'intensità della luce (COON 1950), delle morfologie dei capelli, naso, statura ecc. con le esigenze dell'habitat (BIASUTTI 1959, COON 1950, MESSERI 1955, ecc.) noi siamo propensi ad ammettere che un simile processo di assuefazione all'ambiente si sia attuato anche per la sensibilità alla PTC. Il carattere legato a questa particolare sensibilità probabilmente è stato smistato in base ad esigenze ecologiche di ordine alimentare, in quanto viene regolato dall'organo del gusto, pur tuttavia non si può escludere che anche l'ambiente fisico, soprattutto quello pedologico, possa aver giocato un ruolo importante, in quanto influenza il metabolismo delle piante e degli animali che forniscono l'alimentazione

all'uomo, come dimostrano anche le recenti ricerche sui microelementi del suolo agenti sul metabolismo degli organismi (KOWALSKI 1955). È logico pertanto pensare che la frequenza fenotipica del carattere sensibilità o meno alla PTC venga influenzata da elementi oligodinamici più o meno concentrati nel suolo e che assorbiti dalle piante e dagli animali locali vengono da questi ceduti all'uomo nell'alimentazione. Questa assunzione alimentare può essere discriminata dall'organo del gusto che è deputato ad esercitare una azione selettiva verso gli alimenti, e pertanto il sapore amaro avvertito così diversamente dalle due categorie dei sensibili o meno alla PTC costituisce un fenomeno fisiologico o para-fisiologico a finalità selettiva verso gli alimenti che a loro volta influenzano diversamente la funzionalità dell'organismo portatore dei due opposti caratteri, agendo soprattutto su organi endocrini quali la tiroide, il pancreas, ecc. (TERRY 1947, SEGELL 1947, MESSERI 1959).

Le tribù somale saggiate col test PTC sarebbero state selezionate in modo da fornire le stigmati da noi riscontrate probabilmente in base alle loro esigenze alimentari. Queste per ora non dimostrano nessun nesso di correlazione con i popoli vicini (Negri del Kenia e Sudanesi) di cui possediamo i dati in proposito, palesano invece una certa similitudine di norme di reazione con popoli lontani sia per origine che per insediamento (Italiani, Tedeschi, Inglesi, Esquimesi ecc.).

È da notare anche che i dati attualmente noti nel mondo sono troppo pochi per poter trarre delle deduzioni di una certa validità e che anche nell'ambito dei popoli relativamente omogenei la variabilità del carattere oscilla notevolmente, come risulta dalla nostra inchiesta regionale italiana.

BIBLIOGRAFIA

- BIASUTTI R., 1959. — *Razze e popoli della Terra*. Utet, Torino.
BOYD W. C., 1948. — *Genetics and the races of man*. Little, Boston.
COON C., 1950. — *Races*. Thomas, Springfield.
DARLINGTON C., 1954. — *I fenomeni della vita*. Macri, Firenze.
DUNN L. and DOBZHANSKY T., 1957. — *Heredity, races and Society*. Mentor Book, New York.
EICKSTEDT E., 1954. — *Rassoukonde der Menschheit*. Stuccart.
FISCHER R., 1938. — *The genetical theory of Natural Selection*. Oxford.
FORD E., 1948. — *Genetica*. Longanesi, Milano.
GATES R. R., 1946. — *Human Genetics*. MacMillan, New York.

- KOWALSKY W., 1955. — *Geochemische oekologie*. Accad. Sci. Mosca.
- MENEGHETTI E., 1954. — *Uomini e topi*. Il Giardino di Esculapio (Roche), 23.
- MESSERI E., 1955. — *Ecologia umana*. Arch. Antropol. Etnol., 85: 17-81.
- , 1959. — *Inchiesta genetica sul comportamento della popolazione italiana di fronte al test della P.T.C.* Caryologia, 12: 265-298.
- MONTAGÚ M., 1951. — *An Introduction to the physical Antropology*. Thomas, Springfield.
- MONTALENTI G., 1959. — *Genetica*. Treves, Napoli.
- PARENTI R., 1955. — *Biologia delle razze umane*. Libreria Goliardica, Pisa.
- SORRE M., 1955. — *Les migrations des peuples*. Flammarion, Paris.
- TERRY M. C. and SEGALL G., 1947. — *The association of diabetes and taste-blindness*. Jour. of Hered., 38: 135-137.
- VALLOIS H., 1948. — *Les races humaines*. Presse Universitaires, Paris.

SUMMARY

The percentage of PTC tasters and not tasters of some tribes in South Somaliland has been calculated. An attempt has been made to explain the phenomenon on an ecological base. The human behaviour to PTC is too scarcely known to lead to any satisfying hypothesis.

RIASSUNTO

L'A. ha ricercato le frequenze fenotipiche della sensibilità o meno alla PTC presso alcune tribù somale meridionali, e ha tentato un inquadramento ecologico del fenomeno sulla base delle scarse nozioni in proposito.

CYTOLOGICAL STUDIES ON THREE SPECIES OF *OXALIS*

by

ARUN KUMAR SHARMA and TAPATI CHATTERJI

Cytogenetics Laboratory, Botany Department, Calcutta University, India *.

(with 12 text-figures)

Received: 27th August 1959.

INTRODUCTION

Species of the genus *Oxalis* are represented in India in tropical areas in general. *O. corniculata* is a common herbaceous weed growing profusely with the aid of runners and is extensively used in indigenous medicines. Several other species are also cultivated as garden plants.

The cytological work so far carried out in the genus *Oxalis* has revealed a number of interesting features. Firstly, in this genus, a number of aneuploid series of chromosome numbers have been found, namely $x = 5, 6, 7, 9$ and 11 (vide DARLINGTON and WYLIE, 1955). In addition to direct aneuploid sets, chromosome numbers other than the diploid sets have also been recorded as exemplified by $2n = 24$ chromosomes in *O. corniculata* (RUTLAND, 1941) and *O. stricta* (WULFF, 1937). High polyploid sets, such as are represented by $2n = 66$ and other high numbers of chromosomes in *O. tuberosa* are also on record (KOSTOFF, DOGADKINA and TICHONOWA, 1935; CARDENS and HAWKES, 1948). Further even in the same species, diploid and polyploid individuals are recorded (HEITZ, 1927; YAMASHITA, 1935), as can be noted in *O. brasilienses* ($2n = 14, 28$).

Though the genus provides matters of considerable cytological interest, a detailed account of the study of their karyotypes is still lacking. The same is true for species growing in India too. It needs no mention that study of karyotypes is specially necessary where such varying basic numbers have been recorded. Such studies provide clues to the derivation of one form from the other. With the aid of the improved methods

* 35, Ballygunj Circular Road, Calcutta 19 (India).

therefore the present work is envisaged to work out the details of structure and behaviour of chromosomes of different species of *Oxalis* and to interpret their phylogeny as far as practicable. In the present paper, observations on three different species of *Oxalis* have been incorporated, forming the first part of the investigation.

MATERIALS AND METHODS

Materials

The present investigation includes the following three species of *Oxalis*.

1. *Oxalis acetosella* Linn.
2. *Oxalis corniculata* Linn.
3. *Oxalis purpurata* Facq.

All the species are delicate herbs, *O. corniculata* is very common and grows profusely throughout the year and propagates regularly by the formation of seeds. The other two species i.e. *O. purpurata* and *O. acetosella* are common garden plants cultivated for their showy and mosaic leaves and beautiful though small and delicate flowers.

O. corniculata was collected from the University College garden and *O. acetosella* and *O. purpurata* were collected from the local nursery in Calcutta.

Method

Somatic chromosomes were studied mainly from temporary Aceto-Orcein squash preparation of root-tips. Roots were collected from plants that were grown in a mixture of sand and soil in earthen-ware pots. Much difficulties were encountered in obtaining healthy roots.

To get well scattered metaphase plate and clear chromosome morphology in mitosis, a number of pretreatment chemicals namely, Para-dichloro-benzene (SHARMA and MOOKERJEA, 1955), Coumarin (SHARMA and BAL, 1954), Aesculin (SHARMA and SARKAR, 1955) and mono-Bromonaphthalene (O'MARA, 1948) were tried but successful results could not be obtained with any of them except with Aesculin which showed scattering of chromosomes. Successful result was obtained by pretreating the roots in cold solution of Aesculin (saturated) for 5-6 hours at 10°-12°C and then fixing in Acetic alcohol (1:1) for one to one and half

hours and later heating them in normal Hydrochloric acid and 2% Aceto-orcein solution mixture (9:1) over a flame for a few seconds. The roots were kept in the Acid-dye mixture for eight to twenty four hours and after that smearing was done in 1% Aceto-orcein solution applying uniform pressure over the cover-slip.

The peak period of division for the somatic cells was between 1 P. M. to 3 P.M.

Meiotic chromosomes were observed from temporary Aceto-carmin squash preparation of anthers.

Method for taking observations:

Figures were drawn at a table magnification of approximately $\times 3000$, using a Zeiss compensating eyepiece $\times 20$ and 1.3 apochromatic objective with an aplanatic condenser.

In the figures the chromosomes with secondary constrictions were drawn by outlines.

OBSERVATIONS

The somatic chromosome numbers of the different species so far investigated range from $2n = 28$ to $2n = 48$. Chromosomes are in general short in length, and size difference is not abrupt ranging from 4μ to 1.1μ .

A critical analysis of the karyotypes of the three different species of *Oxalis* distinguishes the following types of chromosomes which are more or less common to all of them, though minor alterations in the representatives of the types are met with in different species.

Type A — A comparatively long chromosome, with two constrictions; one primary and the other secondary, located in nearly median positions very close to each other at the middle of the chromosome.

Type B — A comparatively long chromosome with a sub-median primary constriction and satellite connected by means of a satellite thread at the distal end of the longer arm.

Type C — Comparatively long chromosomes with nearly median to sub-median primary constrictions.

Type D — Comparatively medium sized chromosomes with median to nearly sub-median primary constrictions.

Type E — Comparatively medium sized chromosomes each with two constrictions; one primary and the other secondary. One of the constrictions is nearly median and another constriction is nearly sub-terminal at the distal end of one of the arms.

Type F — Comparatively short chromosomes with sub-median primary constrictions.

Type G — Very short chromosomes with median to sub-median primary constrictions.

Oxalis acetosella Linn.

Stemless, rootstock creeping scaly, leaves all radical 3-foliate leaflets broadly obcordate, stipules large broad membranous, petals pale-rose, veined with purple.

Somatic chromosome number of this species is $2n = 30$ (fig. 1). The length of the chromosomes ranges from $4\mu - 1.5\mu$. Size difference is not abrupt, one type gradually merging with the other (fig. 2). On the basis of comparative size difference the chromosomes can be grouped as follows:

- I. Four pairs of comparatively long chromosomes.
- II. Four pairs of comparatively medium sized chromosomes.
- III. Five pairs of comparatively short chromosomes.
- IV. Two pairs of very short chromosomes.

➡

Figs. 1-5 — *Oxalis acetosella* Linn. Figs. 1 and 2. Somatic metaphase plate showing 30 chromosomes and idiogram of the same respectively. — Fig. 3. Diakinesis showing 15 bivalents. — Fig. 4. First meiotic metaphase showing 15 bivalents. — Fig. 5. Second meiotic metaphase showing 15 chromosomes.

Figs. 6-8 — *O. corniculata* Linn. Figs. 6 and 7. Somatic metaphase showing 48 chromosomes and idiogram of the same respectively. — Fig. 8. Variation somatic metaphase plate showing 30 chromosomes.

Figs. 9-12 — *O. purpurata* Facq. Figs. 9 and 10. Somatic metaphase plate showing 28 chromosomes and idiogram of the same respectively.

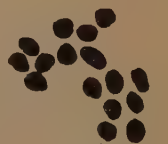
Figs. 11 and 12. Variation somatic metaphase plate showing 26 and 30 chromosomes respectively.



1



3



4



2



5



6



8



9



7



10



12



11

A detailed karyotypic analysis on the basis of size and positions of the primary and secondary constrictions is represented in the following table.

TABLE I

Type	Number	Length	Special features
A	1 pair	4 μ	Comparable to normal A type
B	1 pair	3.8 μ	Comparable to type B
C	2 pairs	3.6 μ - 3.5 μ	Comparable to normal C type
D	3 pairs	3 μ - 2.8 μ	Comparable to normal D type
E	1 pair	2.75 μ	Comparable to normal E type
F	5 pairs	2.3 μ - 2 μ	Comparable to normal F type
G	2 pairs	1.5 μ	Comparable to normal G type

Meiosis in this species is regular. Clear fifteen bivalents in diakinesis and metaphase I were observed and fifteen chromosomes were seen in metaphase II (figs. 3, 4 and 5).

Oxalis corniculata Linn.

A very variable weed, abundant in cultivated places. Leaves long petioled; leaflets obcordate. Flowers subumbellate, petals yellow, obcordate.

Somatic chromosome number of this species is $2n = 48$ (fig. 6). Chromosomes are in general short ranging from 2.83 μ - 1.16 μ (fig. 7). According to relative length of the chromosomes they may be grouped as follows:

- I. Four pairs of comparatively long chromosomes.
- II. Eight pairs of medium sized chromosomes.
- III. Six pairs of comparatively short chromosomes.
- IV. Six pairs of very short chromosomes.

A detailed karyotype of this species is tabulated below.

TABLE II

Type	Number	Length	Special features
B ₁	1 pair	2.3 μ	Differs from normal B type in the absence of the satellite thread. The end satellite is much longer than in the normal B
D	7 pairs	2.3 μ - 1.83	Comparable to normal D type
E	3 pairs	2.83 μ - 2.16	One pair is slightly longer than the normal
E ₁	1 pair	1.83 μ	Differs from normal E type being much smaller. One of the constrictions is median and another is located at the distal end of one of the arms
F	6 pairs	1.6 μ - 1.5 μ	Comparable to normal F type
G	6 pairs	1.3 μ - 1.16 μ	Comparable to normal G type

Beside the normal number $2n = 48$, nuclei containing $2n = 30$ chromosomes were also observed (fig. 8).

Oxalis purpurata Facq.

Plant stemless; root stock short and globose; leaves all radical; 3-foliate; leaflets obcordate; stipules short, flowers small in corymb; petals pinkish-violet.

The somatic chromosome number of this species is $2n = 28$ (fig. 9). Chromosomes are in general very short and size difference is not marked (fig. 10). According to the relative size, chromosomes may be grouped as follows:

- I. Two pairs of comparatively long chromosomes.
- II. Five pairs of comparatively medium sized chromosomes.
- III. Five pairs of comparatively short chromosomes.
- IV. Two pairs of very short chromosomes.

A detailed karyotype of this species is represented in the following table.

TABLE III

Type	Number	Length	Special features
B ₁	1 pair	2.3 μ	Differs from B type, by the absence of satellite thread. The satellite is larger than in normal B type
E	1 pair	2.6 μ	Comparable to normal E type
D	5 pairs	2 - 1.83 μ	Comparable to normal D type
F	5 pairs	1.6 μ - 1.5 μ	Comparable to normal F type
G	2 pairs	1.3 μ	Comparable to normal G type

Along with the normal number ($2n = 28$) nuclei with $2n = 26$ and 30 chromosomes were also noted (figs. 11 and 12).

DISCUSSION

Cytological studies in three different species of *Oxalis* presented in the text indicate that none of them shows identical chromosome number: $2n = 30$, 28 and 48 chromosomes have been noted in *O. acetosella*, *O. purpurata* and *O. corniculata* respectively. It is interesting to note that in *O. acetosella* the chromosome number reported by NAKAJIMA (1936) from a Japanese individual is $2n = 22$. The presence of individuals with 22 and 30 chromosomes in same species is rather significant. The occurrence of individual having $2n = 30$ chromosomes in Indian species as compared with $2n = 22$ chromosomes of Nakajima suggests that the former represents duplication of some of the chromosomes of the latter. In any case such individuals with such widely different genotypes need further scrutiny.

Similar is the case, to some extent with *O. corniculata*. Individuals studied here with $2n = 48$ chromosomes obviously represent a polyploid level as the British materials reported by RUTLAND (1941) showed $2n = 24$ chromosomes. The presence of low chromosome number in temperate representatives and high in the tropical ones is noteworthy. It will be interesting to observe the behaviour of the temperate representatives when transferred to the tropical plains. Possibly here polyploidy is associated with an increase in the tolerance range of the temperature of the environment in which the plant grows. This species provides plants having cytoecological significance.

As regards the other species *O. purpurata*, in which $2n = 28$ chromosomes have been counted here, no previous count is on record.

In view of the present data as well as the previous records as outlined in short in the introductory part of the paper, it appears that both aneuploidy and polyploidy had played a significant role in evolution of the species. The occurrence of clear fifteen bivalents during meiosis of *O. acetosella* suggests its allopolyploid constitution in view of the fact that much lower numbers namely $x = 6, 7$, etc. have been reported in species of *Oxalis* (HEITZ 1927, WULFF l.c.). If it is considered that all these numbers are just derived one from the other then, only allopolyploidy can account for absence of any multivalents in species with such high chromosome numbers as $2n = 30$.

It must be emphasized in this connection that since widely differing chromosome numbers, such as $2n = 22$ and 30 in *O. acetosella* have been noted, there is no reason to assume the presence of different basic series such as $X = 5, 7, 9$ and 11 in this family. All of them are just derivation of one from the other, and even in the same species as the indications show, there is every possibility of the occurrence of individuals with different chromosome numbers. In addition to the present report the case of *O. versicolor* may be cited where $2n = 14$ and 30 chromosomes have been reported by HEITZ (1927) and YAMASHITA (1935) respectively.

The means through which aneuploid individuals arise in nature is yet to be investigated. Meiosis in species so far studied has been found to be regular. It may be recollected that in somatic tissue a few cells with varying chromosome numbers such as $2n = 30$ in *O. corniculata* $2n = 26, 30$ etc. in *O. purpurata* have been found. As the species of *Oxalis* reproduce extensively through vegetative means too, there is every likelihood that somatic variation may contribute to the speciation through their participation in formation of young shoots. In any case, a thorough study of meiosis of different individuals in all the species should be made to find out the possibility of such somatic variation entering into the formation of germ cells as well. As uptil now no such germ cell with different chromosome numbers have been formed, it appears that these altered somatic nuclei may effect speciation in plants propagating through vegetative means.

In addition to the role of polyploidy and aneuploidy the importance of karyotypic alterations in evolution of species cannot at all be ignored. Detailed karyotype analysis of three species presented in the text bring

out clearly the differences in their chromosome morphology. The karyotype in none of them is identical with other. This is a fact which itself signifies the part played by chromosomal alterations in structure in the evolution of different taxonomic units of *Oxalis*.

SUMMARY

1) A cytological analysis of three different species of the genus *Oxalis* has been carried out. The following are the names of the species investigated.

1. *Oxalis acetosella* Linn. ($2n = 30$)
2. *Oxalis corniculata* Linn. ($2n = 48$)
3. *Oxalis purpurata* Facq. ($2n = 28$).

2) In view of the previous and present data, it appears that both aneuploidy and polyploidy had played a significant role in evolution of the species. The presence of different levels of polyploidy in the plains and the hills show that polyploidy is possibly associated with an increase in the tolerance range of the temperature of the environment in which the plant grows.

3) Meiosis so far studied is found to be regular and no multivalent formation was noted which suggests its allopolyploid nature.

4) The occurrence of individuals with aneuploid chromosome numbers as well as the presence of varying chromosome numbers in the somatic tissue show that possibly this is a mode of speciation in this group and the different numbers are propagated through vegetative reproduction.

REFERENCES

- CARDENAS M. and HAWKES J. G., 1948 *. — Rev. Agric. Cochabamba, **4**: 30.
HEITZ E., 1927 *. — Abh. Naturw. Hamburg, **21**: 47.
KOSTOFF D., DOGADKINA H. and TICHONOWA A., 1935 *. — Dokl. Acad. Nank. U.R.S.S., **3**(8): 401.
NAKAJIMA G., 1936 *. — Jap. J. Genet., **12**: 211.
O'MARA J. G., 1948. — Studies at prophase and metaphase in meristems. Stain. Tech., **23**: 201.

- RUTLAND J. P., 1948. — *The Merton Catalogue. A list of chromosome numbers of British plants*, Supplement n. 1, New Phytol., **40**: 210.
- SHARMA A. K. and BAL A. K., 1953. — *Coumarin in chromosome analysis*. Stain Tech., **28**: 255-257.
- SHARMA A. K. and MOOKERJEE A., 1955. — *Paradichloro-benzene and other chemicals in chromosome work*. Stain Tech., **30**: 1.
- SHARMA A. K. and SARKAR S., 1955. — *A new technique for the study of chromosomes of Palms*. Nature, **176**: 261.
- WULF H. D., 1937 *. — Ber. Dtsch. Bot. Ges., **55**: 202.
- YAMASHITA K., 1935 *. — Jap. J. Genet., **11**: 360.

* Referred in: DARLINGTON and WYLIE. — *Chromosome Atlas of flowering plants*. Allen Unwin Ltd., London.

RIASSUNTO

Indagini citologiche sul genere *Oxalis* hanno stabilito il numero cromosomico di tre specie: *Oxalis acetosella* L. $2n = 30$, *O. corniculata* L. $2n = 48$, e *O. purpurata* Facq. $2n = 28$.

Dal confronto fra questi dati e quelli precedentemente noti si deduce che tanto la aneuploidia quanto la poliploidia sono state responsabili dell'evoluzione delle specie. La presenza di differenti livelli di poliploidia nelle pianure e sulle colline mostra che la poliploidia è probabilmente associata con un aumento di tolleranza della temperatura nell'ambiente in cui la pianta vive.

La meiosi è stata trovata regolare e non sono stati osservati multivalenti che depongano per una natura allopoliploide.

La presenza di individui con numeri di cromosomi aneuploidi e la variazione del numero dei cromosomi nel tessuto somatico dimostrano che l'aneuploidia può essere un meccanismo di speciazione in questo gruppo sistematico e che i differenti numeri dei cromosomi possono essere propagati dalla riproduzione vegetativa.

ANALISI MORFOMETRICA DEI CROMOSOMI DI *BOS TAURUS* L.

(con Tavole LXXVIII-LXXIX e 1 figura nel testo) *

In redazione: il 16 gennaio 1960.

La facile reperibilità di ingenti quantità di cellule ricavate in genere dal tessuto renale e la larga disponibilità di siero omologo fanno considerare il bue come un materiale di elezione per lo studio di alcuni problemi della genetica di cellule somatiche in vitro.

La coltura di rene di bue è stata da noi scelta allo scopo di condurre un'analisi il più possibile controllata della stabilizzazione del numero dei cromosomi in vitro. Per questo è necessaria una analisi molto approfondita del cariotipo che permetta di seguire variazioni numeriche e morfologiche alle quali potranno andare incontro i cromosomi nelle cellule propagate in coltura continua.

I dati finora disponibili sui cromosomi di *Bos taurus* sono stati ottenuti dall'esame diretto di frammenti di gonade (KRALLINGER 1927, 1928, 1931; MAKINO 1943, 1944; BATTAGLIA e CENNI 1959). In queste condizioni l'osservazione è oltremodo difficile ed il margine di errore è sempre considerevole. Le tecniche cariologiche applicate alle colture in vitro hanno reso più agevole il conteggio dei cromosomi e lo studio della loro morfologia.

Qui di seguito sono presentati i risultati di una analisi così condotta sui cromosomi di *Bos taurus*.

MATERIALI e METODI

Tecniche di coltura - Reni di vitello appartenenti ad individui diversi (due maschi ed una femmina) appena asportati sono stati sottoposti a ripetuti lavaggi in soluzione salina di Hanks con antibiotici (penicillina 300 U/cc, streptomicina 300 γ /cc). È stata quindi isolata la

* Lavoro eseguito nell'Istituto di Genetica dell'Università di Pavia.

parte corticale del rene e suddivisa in piccoli frammenti i quali sono stati posti in una soluzione al 3% in Hanks di tripsina Difco 1:250 e mantenuti a 4° C per 2 h. Questo pretrattamento ha lo scopo di impregnare il tessuto di tripsina prima che si inizi l'azione enzimatica. L'isolamento delle cellule dai frammenti è stato ottenuto a 38° C mantenendo i frammenti in movimento con agitatore elettromagnetico.

La sospensione di cellule è stata quindi centrifugata a 1000 giri per 15 minuti dopo aggiunta di terreno gelato per bloccare l'azione enzimatica della tripsina.

Le cellule sono state seminate in capsule Petri da 6 cm., contenenti un vetrino coprioggetto, nella quantità di 10⁶ per ciascuna. Il terreno di coltura adoperato è la soluzione di Eagle con il 20% di siero di vitello.

Dopo un giorno dalla semina il terreno è stato ricambiato asportando così i detriti e le cellule non attaccate al vetro.

Dopo circa tre giorni la coltura era pronta per essere osservata presentando un tappeto continuo di cellule.

Trattamento ipotonico - Per ottenere la dispersione dei cromosomi è stato eseguito il trattamento ipotonico portando i vetrini in una soluzione 1:8 di terreno completo e H₂O distillata per 35' a 37° C. Non è stato fatto uso di colchicina.

Fissazione - La fissazione effettuata con Carnoy per 10' è stata preceduta da una brevissima prefissazione eseguita aggiungendo alcune gocce di fissativo alla soluzione ipotonica. Questo trattamento, facendo precipitare le proteine, migliora la dispersione dei cromosomi. Dopo fissazione i preparati sono stati fatti essiccare all'aria.

Colorazione - I vetrini così trattati sono stati colorati col colorante Bleu de Unna della R.A.L. secondo la scheda seguente:

- 1) Idrolisi in HCl 1N a 60° C per 7';
- 2) Lavaggio in acqua distillata ripetuto più volte;
- 3) Passaggio in colorante per 7';
- 4) Lavaggio in acqua distillata;
- 5) Passaggio in alcool assoluto e montaggio.

La colorazione è generalmente elettiva e difficilmente il preparato si sovraccolora; in questo caso basta un semplice passaggio in acqua leggermente acidulata per asportare il colorante in eccesso.

Analisi numerica e morfometrica dei cromosomi

Il numero dei cromosomi del bue, per un valore di $2n = 60$, era già noto fin dal 1927 (KRALLINGER). Questo numero è stato riscontrato in una trentina di piastre metafasiche chiaramente leggibili di entrambi i sessi (Tav. LXXIX, fig. 3).

Oltre queste sono state contate alcune altre piastre che presentavano un numero di cromosomi doppio o quadruplo da imputarsi a fenomeni di endoreduplicazione ai quali, come noto, vanno particolarmente soggette le cellule in cultura.

Morfologicamente i cromosomi di bue si presentano quasi tutti telocentrici con centromero quasi sempre assolutamente terminale.

L'accoppiamento in omologhi dei vari cromosomi per i due sessi ha chiaramente messo in evidenza per il maschio una coppia eteromorfa di cromosomi che indicano il sesso maschile come eterocromosomico. Un elemento di questa coppia, e precisamente quello mediocentrico, si trova in numero duplice nel cariotipo femminile.

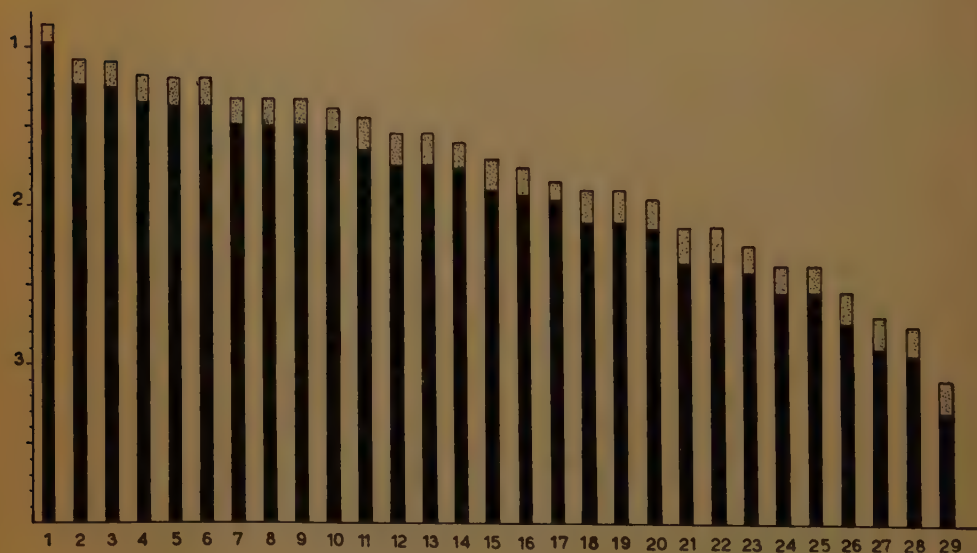


Fig. 1. — Rappresentazione grafica delle lunghezze relative dei cromosomi di bue. Sulle ordinate sono riportati i valori dell'indice X/n . La parte punteggiata indica l'ambito di variabilità delle varie misure.

Essendo questo cromosoma mediocentrico l'unico di questo tipo e pertanto facilmente individuabile in una piastra, abbiamo preso questo come unità di misura ed abbiamo costruito un indice caratteristico per ciascun cromosoma per piastre differenti, dividendo la misura di questo per ciascun altro cromosoma (X/n).

Sul grafico della fig. 1 si sono riportati sulle ascisse i valori di questo indice per cinque piastre (3 femminili e 2 maschili) e sulle ordinate si sono elencati i singoli cromosomi in successione di grandezza. La zona punteggiata rappresenta l'ambito di variabilità fra le misure.

Come si può osservare l'ambito di variabilità fra le diverse misure è piuttosto limitato, tuttavia è quasi sempre assai difficile distinguere due cromosomi vicini.

Un grafico di questo tipo riteniamo possa essere utile nella identificazione di eventuali variazioni morfologiche e numeriche durante la stabilizzazione in vitro e per la comparazione con piastre di specie affini.

Come abbiamo detto i cromosomi di questa specie si presentano tutti a centromero terminale tranne il cromosoma X che si presenta mediocentrico. Caratteristica del cromosoma X è quella di avere il braccio più corto pari ad un terzo della lunghezza totale del cromosoma.

Il cromosoma Y risulta di difficile individuazione tuttavia dalle ricostruzioni fatte risulterebbe essere di media grandezza, pressochè simile per dimensioni all'autosoma 10.

Considerazioni generali di sistematica cromosomica e di evoluzione nei Bovidae.

Le specie che sono state studiate per il numero dei cromosomi nella famiglia dei *Bovidae* sono riportati nella Tabella I dove ci siamo limitati ad elencare i dati più attendibili.

Dai dati riportati nella tabella risulta evidente che la maggior parte delle specie finora studiate per il numero dei cromosomi nell'ambito della famiglia dei *Bovidae* presenta un numero diploide di $2n = 60$. Fra le specie che differiscono da questo numero esistono ancora incertezze essendo i dati non perfettamente concordanti.

MATTHEY (1949) dà molta importanza al numero delle braccia dei cromosomi (NF = numero fondamentale) come fattore di evoluzione e di caratteristica sistematica.

Questo numero fondamentale (NF) per i bovidi finora studiati sarebbe, secondo MATTHEY, pari a 60, ad eccezione di quello del *Bubalus bubalis*.

In base alle osservazioni da noi fatte su *Bos taurus*, la presenza del cromosoma X metacentrico porterebbe questo numero a 62 (♀). Questa discordanza è da imputarsi al mancato riconoscimento di cromosomi metacentrici nei cariotipi finora proposti per *Bos taurus*.

TABELLA I

Numeri cromosomici nella famiglia dei Bovidae

BOVIDAE	2n	n	Note	Referenze
<i>Bos indicus</i>	60s	30 ♂ (I)	X-Y ♂	MAKINO 1944.
<i>Bos taurus</i>	60s	30 ♂ (I,II)	X-Y ♂	KRALLINGER 1927, 1928, 1931; MAKINO 1943, 1944; BATTAGLIA e CENNI 1939.
<i>Bubalus buffelus</i>	56s	—	X-Y ♂	PKAKADZE 1939.
<i>Bubalus buffelus</i>	48s	24 ♂ (I,II)	X-Y ♂	MAKINO 1943, 1944.
<i>Capra hircus</i>	60s	30 ♂ (I,II)	X-Y ♂	SOKOLOV 1930; SHIWAGO 1930, 1931; KRALLINGER 1931; BERRY 1938; MAKINO 1943, 1944.
<i>Ovis aries</i>	60s	30 ♂ (I,II)	X-Y ♂	KRALLINGER 1931; NOVIKOV 1935; BRUCE 1935; PCHAKADZE 1936.
<i>Ovis aries</i>	54s,m	27 ♂ (I,II)	X-Y ♂	BERRY 1938, 1941; AHMED 1940; MAKINO 1943, 1944.
<i>Ovis polli-karelini</i>	60s	30 ♂ (I)	—	BUTARIN 1935a, 1935b.
<i>Ovis steatopyga</i>	—	30 ♂ (I)	—	BUTARIN 1935a, 1935b.
<i>Poëphagus grunniens</i>	62 ± 2s	31 ± 1 ♂ (I)	X-Y ♂	ZUITIN 1935.

Notazioni: ♂ (I) = spermatociti di primo ordine; ♂ (II) = spermatociti di secondo ordine (da MAKINO, modificata).

Date le peculiari caratteristiche morfologiche che abbiamo prima discusso per la specie da noi studiata e che probabilmente sono proprie della maggior parte delle specie di questa famiglia riteniamo potrebbe essere interessante analizzare la morfologia dei cromosomi dei generi e delle specie i cui assetti cromosomici differiscono da questo numero che, seguendo la terminologia del MATTHEY, possiamo definire fondamentale per i Bovidae al fine di verificare, con dati sperimentali, la ipotesi ro-

bertsoniana delle fusioni centriche insistentemente avanzata ed eventualmente di poter stabilire per quali di detti cromosomi essa possa preferenzialmente avvenire.

BIBLIOGRAFIA

- AHMED I. A., 1940. — *The structure and behavior of the chromosomes of the sheep during mitosis and meiosis*. Proc. Roy. Soc. Edinburgh, **60**: 260-270.
- BATTAGLIA E. e CENNI B., 1959. — *Contributo alla cariologia di Bos taurus L.* Caryologia, **12**: 162-172.
- BERRY R. D., 1938. — *Chromosome Numbers in sheep, goat and sheep-goat Hybrids*. J. Hered., **29**: 343-350.
- , 1941. — *The cromosome complex of domestic sheep (Ovis aries)*. J. Hered., **32**: 251-267.
- BUTARIN N S., 1935. — *The chromosome complex of ashar (Ovis pollii Karelini Scr.) Kurdiuchny ram (O. steatopyga) and their F₁ hybrid*. C. R. Acad. Sci. U.S.S.R., **4**: 287-290.
- CHIARELLI B., NUZZO F., DE CARLI L., AULISA B., 1959. — *Morphometric analysis of human chromosomes*. Congr. Gen. Napoli (in press).
- KRALLINGER H. F., 1927. — *Über die Chromosomenzahl beim Rinde sowie einige allgemeine Bemerkungen über die chromonsomenforschung in der Säugetierklasse*. Anat. Anz., **63**: 209-224.
- , 1928. — *Gibt es einen Spermatozoen dimorphismus beim Hausrind? Zugleich eine Chromosomenstudie und ein Beitrag zur Kritik der Chromosomenlehre*. Arb. Deutsch. Gesellsch. Züchtungskunde, **40**: 1-43.
- , 1931. — *Cytologische Studien en einigen Haussäuge tieren*. Arch. Tierernähr. Tierzucht., **5**: 127-187.
- MAKINO S., 1943. — *The chromosome complexes in goat (Capra hireus) and sheep (Ovis aries) and their relationship*. Chromosome studies in domestic mammals II. Cytologia, **13**: 39-54.
- MATHEY R., 1949. — *Les chromosomes des vertébrés*. Lib. Univ., Lausanne.
- NOVIKOV I. I., 1935. — *Chromosomes in the spermatogenesis of interspecific hybrids of the European mouflon and the domesticated sheep (merino)*. C. R. Acad. Sci. U.S.S.R., **4**: 93-94.
- PCHAKADZE G., 1936. — *A new data about the chromosome number in domestic sheep*. C. R. Acad. Sci. U.S.S.R., **3**: 333-334.
- , 1939. — *Chromosome complement in buffalo. (B. buffelus L.)*. C. R. Acad. Sci. U.S.S.R., **24**: 794-795.
- SHIWAGO P. G., 1931. — *Karyotypische Studien an Ungulaten. I. Über die chromosomen Komplexe der Schafe und Ziegen*. Zeitschr. Zellf. Mikrosk. Anat., **13**: 511-522.

- SOKLOV I., 1930. — *The chromosomes in spermatogenesis of the goat (Capra hircus)*.
Bull. Bureau Genet. Acad. Sci., U.S.S.R., 8:
- ZUITIN A. L., 1935. — *On the chromosomes of the yak (Poëphagus grunniens L.)*
(Russ., with engl. summ.). C. R. Acad. Sci. U.S.S.R., 4: 8-83.
- , 1938. — *New data on the chromosome number in yak (Poëphagus grunniens L.)*.
C. R. Acad. Sci., 13: 201-202.

SPIEGAZIONE DELLE TAVOLE LXXVIII-LXXIX

TAVOLA LXXVIII

Fig. 1. — Microfotografia ed arrangiamento in coppie di omologhi dei cromosomi di un maschio (in alto) e di una femmina (in basso) di *Bos taurus* L.

TAVOLA LXXIX

Fig. 2. — Piastra metafasica diploide ($2n=60$) di *Bos taurus* ♀. Le frecce indicano gli eterocromosomi. (Ingrandimento: $\times 1250$).

Fig. 3. — Piastra metafasica tetraploide ($4n=120$) di *Bos taurus* ♂. Le frecce indicano i cromosomi X. (Ingrandimento: $\times 1250$).

Fig. 4. — Piastra metafasica ottoploide ($2n=240$) di *Bos taurus* ♂. Le frecce indicano i cromosomi X. (Ingrandimento: $\times 1250$).

SUMMARY

By means of tissue culture technique has been possible make a morphometric analysis on the chromosomes of *Bos taurus* L. Such a study allowed the individuation of heterochromosomes and also to classify all the autosomes as telocentric. This peculiar character we think it is interesting not only for systematics, but also for the study of variations of chromosome during the stabilization of a cell line in vitro.

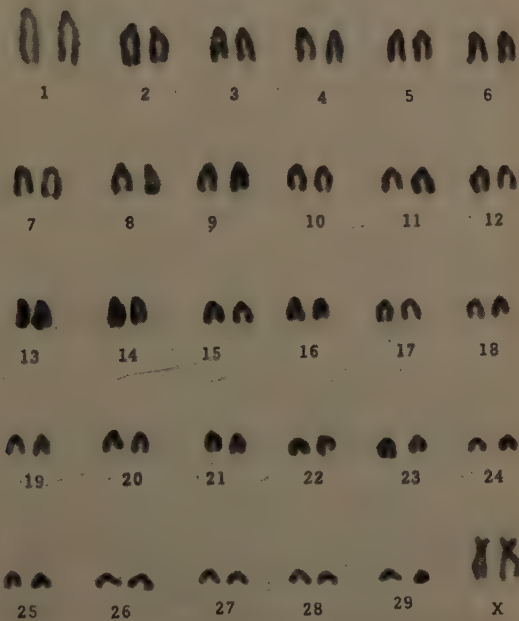
RIASSUNTO

Per mezzo della tecnica delle colture di tessuti è stato possibile compiere uno studio morfometrico sui cromosomi di *Bos taurus* L. Un tale studio ha reso possibile individuare gli eterocromosomi e classificare tutti gli autosomi come telocentrici. Questa peculiare caratteristica pensiamo possa rivelarsi interessante non solo ai fini sistematici, ma anche per lo studio delle variazioni che subiscono i cromosomi durante la stabilizzazione in vitro di un ceppo di cellule.

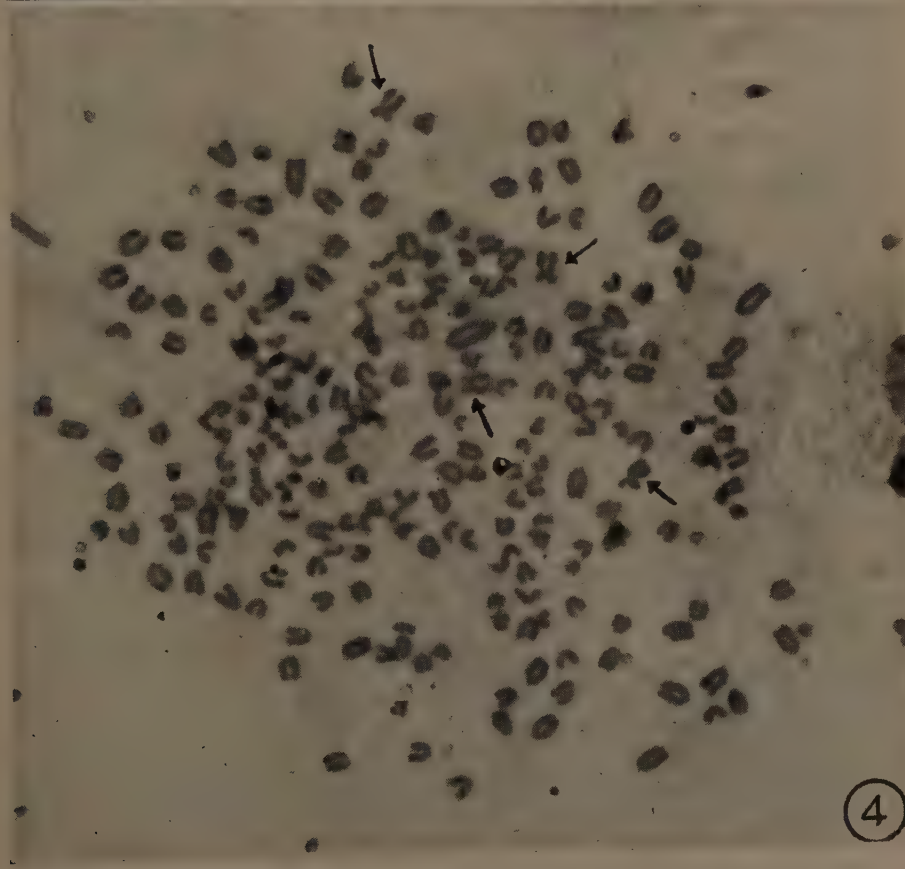
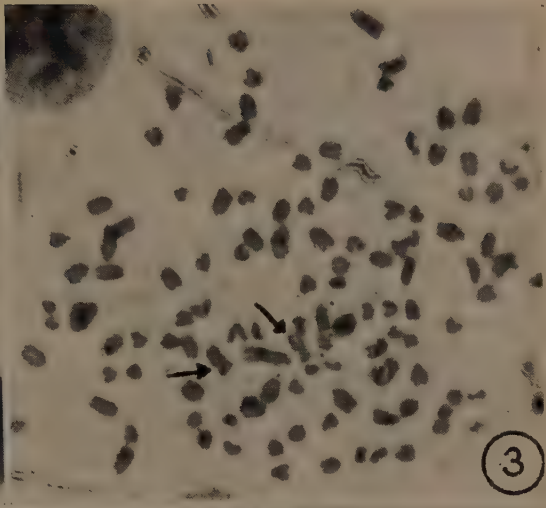
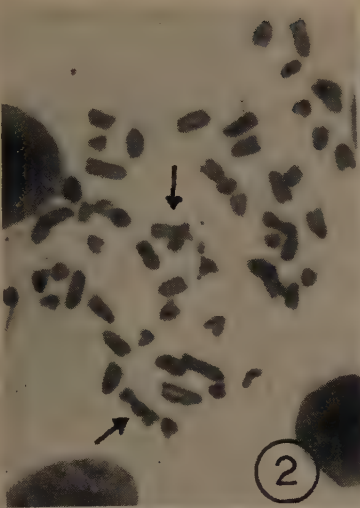
Ricostruzione in coppie
di omologhi di cromosomi
di Bos taurus L. ♂



Ricostruzione in coppie
di omologhi di cromosomi
di Bos taurus L. ♀







CHIARELLI B., DE CARLI L. e NUZZO F. — Analisi morfometrica dei cromosomi di *Bos Taurus* L.

I N D I C E

- ATSMON DAN and FEINBRUN NAOMI — Chromosome counts
in Israeli Cistaceae (with Plate XXXIII) . . . pp. 240-246
- CASATI ANNIBALE — Questioni di radiobiologia generale. 6.
La « zona d'azione » (con 15 figure nel testo) . . . » 659-712
- CHATTERJI T. — Vedi: SHARMA A. K. and CHATTERJI T.
- CHIARELLI B., DE CARLI L. e NUZZO F. — Analisi morfome-
trica dei cromosomi di *Bos taurus* L. (con Tavole
LXXVIII-LXXIX e una figura nel testo) . . . » 766-772
- CHIARUGI ALBERTO — Tavole cromosomiche delle Pterido-
phyta . . . » 27-150
- CRISTOFORI F. — Vedi: GEROLA F. M., CRISTOFORI F. e
DASSÙ G.
- D'AMATO FRANCESCO — Cyto-histological investigations of
antimitotic substances and their effects on patterns of
differentiation . . . » 339-351
- DASSÙ G. — Vedi: GEROLA F. M., CRISTOFORI F. e DASSÙ G.
- DASSÙ G. — Vedi: GEROLA F. M. and DASSÙ G.
- DATTA MRIDULA — Cytogenetical studies on some ornamental
Jasmines (with Plates LXXV-LXXVII and 36 text-fi-
gures) . . . » 713-748
- DE CARLI L. — Vedi: CHIARELLI B., DE CARLI L. e NUZZO
F.
- Elenco delle pubblicazioni di Alberto Chiarugi . . . » 2- 14
- FABRI FERNANDO — Contributo per l'interpretazione della
persistenza nucleolare durante la mitosi in *Psilotum nu-
dum* (L.) Beauv. (con Tavole XL-XLIII e 8 figure nel
testo) . . . » 297-337
- FABRI FERNANDO — Un sonetto di Benedetto Varchi in onore
di Luca Ghini . . . » 338
- FEINBRUN NAOMI — Vedi: ATSMON DAN and FEINBRUN NAOMI.

- GEROLA F. M., CRISTOFORI F. e DASSÙ G. — Ricerche sulle infrastrutture delle cellule del mesofillo fogliare di piante sane e virosate di Tabacco (*Nicotiana tabacum*). A: piante sane (con Tavola XLIV e una figura nel testo) pp. 352-366
- GEROLA F. M., CRISTOFORI F. e DASSÙ G. — Ricerche sulle infrastrutture delle cellule del mesofillo fogliare di piante sane e virosate di Tabacco (*Nicotiana tabacum*). B: piante virosate (con Tavole XLV-XLIX) . . . » 367-378
- GEROLA F. M., CRISTOFORI F. e DASSÙ G. — Ricerche sullo sviluppo dei cloroplasti di Pisello (*Pisum sativum* L.) I: Sviluppo dei cloroplasti in piantine cresciute in condizioni di normale alternarsi di luce e di buio (con Tavole I-XI) . . . » 164-178
- GEROLA F. M., CRISTOFORI F. e DASSÙ G. — Ricerche sullo sviluppo dei cloroplasti di Pisello (*Pisum sativum* L.) II: Sviluppo dei cloroplasti in piantine eziolate e loro modificazioni durante il successivo inverdimento (con Tavole XII-XXXII) . . . » 179-197
- GEROLA F. M. e DASSÙ G. — Variazioni delle infrastrutture dei cloroplasti di Tabacco (*Nicotiana tabacum*) durante l'imbianchimento sperimentalmente indotto delle foglie e il loro successivo rinverdimento (con Tavole L-LIII) » 398-410
- Indici dei Volumi di Caryologia pubblicati sotto la direzione di Alberto Chiarugi . . . » 15- 25
- KHANNA K. R. — Cytological studies in some Himalayan Mosses (with Plates LXVIII-LXIX and 103 text-figures) » 559-618
- KHOSHOO T. N. and RAJ B. — Seed development following the reciprocal matings between the diploid and the autotetraploid strains of *Sisymbrium irio* var. *subtorulosum* (with 26 text-figures) . . . » 379-397
- MALIK C. P. and TANDON S. L. — Meiotic abnormalities and failure of spindle mechanism in *Suaeda fruticosa* Forsk. (with Plate LXV-LXVI) . . . » 516-522
- MARIMUTHU K. M. — Vedi: SEN N. K. and MARIMUTHU K. M.
- MASETTI ZANNINI ALESSANDRA — La successione dei fenomeni di differenziamento citosessuale nella gonade giovanile di *Helix cineta* Mull. (con Tavole XXXVII-XXXIX) . . . » 285-296
- MATTHEY ROBERT — Chromosomes, hétérochromosomes et cytologie comparée des Cricetinae Paléarctiques (Rodentia) (avec 36 figures dans le texte) . . . » 199-223
- MAUGINI ELENA — Ricerche sulla citogeografia e sulla tassonomia dell'*Urginea maritima* Bak. (con una figura nel testo) . . . » 151-163

- MEHRA P. N. and VERMA S. C. — Cytotaxonomic observations on some west Himalayan Pteridaceae (with Plates LXX-LXXIV and 22 text-figures) pp. 619-650
- MESSERI ENRICO — Considerazioni ecologiche sul colore degli occhi fra i Somali (con Tavola LXVII e 10 figure nel testo) » 544-555
- MESSERI ENRICO — Considerazioni geografiche sulla sensibilità al test *PTC* in Somalia (con una figura nel testo) » 749-754
- MESSERI ENRICO — Considerazioni geografiche sulle frequenze dei gruppi sanguigni *ABO* in alcune tribù somale (con 7 figure nel testo) » 469-485
- MESSERI ENRICO — Considerazioni sulla espressione fenotipica del colore degli occhi in Sicilia e in Toscana (con 6 figure nel testo) » 224-239
- MESSERI ENRICO — Osservazioni geografiche sulla espressione fenotipica del lobulo auricolare in Africa orientale (con 3 figure nel testo) » 651-658
- MESSERI ENRICO — Ricerca sperimentale sul comportamento fenotipico degli epilettici verso il test *PTC* (con una figura nel testo) » 430-443
- NUZZO F. — Vedi: CHIARELLI B., DE CARLI L. e NUZZO F.
- Pubblicazioni del « Centro di Studio per la Citogenetica Vegetale del Consiglio Nazionale delle Ricerche », diretto dal Prof. ALBERTO CHIARUGI: N. 226-257 . . . » 556-558
- QUATTRINI DILETTO — Osservazioni su un passaggio di ribonucleoproteine dal citoplasma al nucleo e su un gruppo di neuroni secernenti nel sistema nervoso centrale dei Molluschi Gasteropodi (con Tavole LV-LX) . . . » 444-468
- RAJ B. — Vedi: KHOSHOO T. N. and RAJ B.
- RANZOLI FULVIO — Ricerche sul comportamento del nucleolo negli ovociti di *Phallusia mamillata* (CUV.) (con Tavole XXXIV-XXXV e 5 figure nel testo) » 247-273
- SALVI FLORIDO — Analisi della variabilità genetica del peso vivo alle età di sei e dodici mesi nei vitelli di razza Chianina (con 3 figure nel testo) » 523-543
- SEN N. K. and MARIMUTHU K. M. — Colchiploids of *Dolichos Lablab* L. (with Plate LIV) » 411-429
- SHARMA A. K. and CHATTERJI T. — Chromosome studies of some members of Polygonaceae (with Plate LXI-LXIII) » 486-506
- SHARMA A. K. and CHATTERJI T. — Cytological studies on three species of *Oxalis* (with 12 text-figures) » 755-765

STEFANI RENZO — L'azione della colchicina sulle cellule dell'epitelio follicolare ovarico degli Embiotteri (con Tavola LXIV)	pp. 507-515
TANDON S. L. — Vedi: MALIK C. P. and TANDON S. L.	
VERMA S. C. — Enucleate spores in <i>Isoetes coromandelina</i> L. (with Plate XXXVI and 6 text-figures) »	274-284
VERMA S. C. — Vedi: MEHRA P. N. and VERMA S. C.	
PREMESSA	» 1

Fascicolo I, pp. 1-338: pubblicato il 10 giugno 1960
 Fascicolo II, pp. 339-558: pubblicato il 30 luglio 1960
 Fascicolo III, pp. 559-772: pubblicato il 15 dicembre 1960

NOTICE TO AUTHORS

CARYOLOGIA is a periodical devoted to the publication of original research in plant and animal cytology, cytosystematics and genetics. One volume, of about 450-500 pages, is issued yearly and it consists of three numbers (*Subscription rate: Lit. 4800 a year*).

Papers, subscriptions, correspondence with reference to editorial matters should be addressed to the Associate Director, Dr. Fernando Fabbri, "Caryologia", Via Lamarmora, 4 - Firenze, Italy.

MANUSCRIPT - Contributions in Italian, English and French are accepted; they should be typewritten and in complete and final form for publication.

The name of the Authors referred to in the Manuscript should be written in capitals and should be followed by the year, in parenthesis, in which the paper was published. Papers referred to in the Manuscript should be listed on a separate page, which follows the main text and before the explanation of the plates. English and Italian summaries should complete the paper.

LITERATURE CITED - The references should be arranged in alphabetical order according to the following style for punctuation and order of listing:

BRACHET J., 1957. — Biochemical cytology. Academic Press, New York.

CHIARUGI A., 1938a. — La cariologia e le sue applicazioni a problemi di botanica. Atti Soc. Ital. Progr. Sci., 3: 55-92.

—, 1938b. — Osservazioni carilogiche e sistematiche sui generi Kerneria e Rhizobotrya (Cruciferae-Thlaspidinae). Nuovo Giorn. Bot. Ital., n. s., 40: 63-75.

TABLES AND FIGURES - In preparing tables and figures for publication the size of the printed page, mm. 120 × 180, should be kept in mind. The figure legends should be submitted on a separate page. Photographs for plates should be carefully mounted on cardboard and the progressive number placed at the lower right angle of each photograph.

PROOFS - The first proofs submitted are sent for corrections to the Author, who should limit to the maximum any alteration of the text. If necessary, the Editorial Secretary will forward also the second proofs, in which only the printer's errors should be corrected.

REPRINTS - The Authors will be furnished, free of charge, with 50 reprints without covers. Additional reprints may be obtained at cost and the order should be written on the proofs.

Authors are responsible for the content and style of their contributions.

INDICE

KHANNA K. R. — Cytological studies in some Himalayan Mosses (with Plates LXVIII-LXIX and 103 text-figures)	pp. 559-618
MEHRA P. N. and VERMA S. C. — Cytotaxonomic observations on some west Himalayan Pteridaceae (with Plates LXX-LXXIV and 22 text-figures)	» 619-650
MESSERI ENRICO — Osservazioni geografiche sulla espressione fenotipica del lobulo auricolare in Africa orientale (con 3 figure nel testo)	» 651-658
CASATI ANNIBALE — Questioni di radiobiologia generale. 6. La « zona d'azione » (con 15 figure nel testo)	» 659-712
DATTA MRIDULA — Cytogenetical studies on some ornamental Jasmines (with Plates LXXV-LXXVII and 36 text-figures)	» 713-748
MESSERI ENRICO — Considerazioni geografiche sulla sensibilità al test PTC in Somalia (con una figura nel testo)	» 749-754
SHARMA A. K. and CHATTERJI T. — Cytological studies on three species of <i>Oxalis</i> (with 12 text-figures)	» 755-765
CHIARELLI B., DE CARLI L. e NUZZO F. — Analisi morfometrica dei cromosomi di <i>Bos taurus</i> L. (con Tavole LXXVIII-LXXIX e una figura nel testo)	» 766-772

(Pubblicato il 15 Dicembre 1960)